

**Multiplex Polymerasekettenreaktion mit  
fluoreszenzoptischer Produktdetektion durch den Einsatz  
von Primern mit „primerintegrierten Reportersequenzen“**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Nikola Weigand  
aus Grossen-Linden

Gießen 2008

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des  
Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen,  
Abteilung Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie  
Leiter: Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer

Gutachter: Prof. Dr. R. Repp

Gutachter: PD Dr. K.H. Reuner

Tag der Disputation: 07.07.2009

Meinen Eltern

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1 - 2</b>
<b>2.</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>3 - 23</b>
2.1	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	3 - 9
2.2	Störfaktoren der Polymerase-Kettenreaktion	9 - 12
2.3	Die Realtime-Polymerase-Kettenreaktion	12 - 15
2.4	Quantitative PCR mit lumineszenzoptischer Produktdetektion	16 - 17
2.5	Die Multiplex-PCR	17 - 18
2.6	Mögliche Anwendungen unterschiedlicher PCR-Formen und ihre Bedeutung	18 - 23
2.6.1	Diagnostik von Infektionen mittels Polymerase-Kettenreaktion	19 - 20
2.6.2	Diagnostik von Leukämien mittels Polymerase-Kettenreaktion	21 – 23
<b>3.</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>24</b>
<b>4.</b>	<b>Methoden</b>	<b>25 - 34</b>
4.1	Kultivierung der Zellen	25
4.2	RNA-Extraktion	26 - 27
4.2.1	RNA-Extraktion aus Vollblut	26
4.2.2	RNA-Extraktion aus Zellkulturen	26 - 27
4.3	Agarose-Gelelektrophorese	27 - 28
4.4	Reverse Transkription	28 - 29
4.5	Reinigung von PCR-Produkten	29 - 30
4.5.1	DNA-Isolierung mit dem QIAquick PCR Purification Kit	29
4.5.2	DNA-Isolierung aus Agarosegelen mit Glasmilch	30
4.6	Polymerase-Kettenreaktion	30 - 31
4.7	Nested-PCR	31 - 32
4.8	Realtime-PCR	33
4.9	Auswahl von Primersequenzen für die PCR	33 – 34

<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35 - 48</b>
5.1	Testung des HANDS-PCR-Prinzips an einem konstitutiv exprimierten Gen („Housekeeping“ Gen)	35 - 39
5.1.1	Herstellung eines Standards	35 - 36
5.1.2	Optimierung der PCR-Bedingungen für den Einsatz des HANDS-Primers	37 - 38
5.1.3	Optimierung der Sondenkonzentration für die Realtime-PCR	38 - 39
5.2	Optimierung der PCR-Bedingungen zum Nachweis chromosomaler Translokationen kindlicher Leukämien	39 - 44
5.2.1	Auswahl der geeigneten Primer zur Detektion prognostisch relevanter chromosomaler Translokationen	40 - 42
5.2.2	Optimierung der PCR-Bedingungen für die Realtime-PCR	42 - 44
5.3	Automatisierter Nachweis chromosomaler Translokationen kindlicher Leukämien mit Hilfe der Multiplex-Realtime-PCR mit primerintegrierten Reportersequenzen	44 – 48
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49 - 54</b>
6.1	Entwicklung einer Multiplex-Realtime-PCR mit fluoreszenzoptischer Produktdetektion über primerintegrierte Reportersequenzen (PIRS)	49 - 51
6.2	Einsatz primerintegrierter Reportersequenzen zum Nachweis prognostisch relevanter chromosomaler Translokationen in Leukämiezellen	51 - 53
6.3	Weitere Anwendungsmöglichkeiten primerintegrierter Reportersequenzen	53 – 54
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>55</b>
<b>8.</b>	<b>Summary</b>	<b>55</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>56 - 62</b>
<b>10.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>63 - 64</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>65</b>

## 1. EINLEITUNG

Die Grundlage aller Erbinformationen jeder Zelle ist die Desoxyribonukleinsäure (DNA). Sie fungiert als Speicher aller Baupläne für Proteinmoleküle der Zelle. Alle Proteine, gleich welcher Funktion, werden nach einem auf der DNA befindlichen Plan synthetisiert. Die entstandenen Proteine wiederum sind dann am Bau der lebenswichtigen Stoffklassen, wie Lipide und Polysaccharide beteiligt. James Watson und Francis Crick entdeckten 1953 die Doppelhelix-Struktur der DNA (Gassen et al., 1996).

Die DNA ist ein Polymer aus vielen Einzelbausteinen, den Desoxyribonukleotiden. Jedes Nukleotid ist eine Verbindung aus Desoxyribose, heterozyklischer Nukleobase (Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin) und einem Phosphormolekül und bildet die Nukleinsäurekette. Das DNA-Molekül der Zelle besteht aus zwei gegenläufigen DNA-Einzelsträngen. Die Einzelstränge sind über Wasserstoffbrücken, die sich zwischen den komplementären Basenpaare (Adenin – Thymin; Guanin – Cytosin) bilden, miteinander verbunden. Jede Base ist mit einer Desoxyribose verbunden und die 5' und 3' Kohlenstoffatome des Zucker untereinander durch Phosphatgruppen. So erhält die einzelsträngige DNA ein 5' und ein 3' Ende. Das 5' Ende eines DNA-Stranges ist komplementär zum 3' Ende (Watson et al., 1953).

Anhand der Abfolge der vier Nukleotide Adenosin, Thymin, Guanin und Cytosin entsteht der genetische Code der Nukleinsäuren. Eine Aminosäure ist durch die genaue Abfolge von drei Nukleotiden definiert, dem sogenannten Triplett. Durch das 5' und 3' Ende ist auch die Leserichtung genau definiert. Neben der DNA, die zur Speicherung der Erbinformationen dient, gibt es die einzelsträngige Ribonukleinsäure (RNA). Diese unterscheidet sich durch ihrer Funktion, ihren Zuckeranteil Ribose und anhand der Base Uracil, die die Base Thymin ersetzt. Sie lässt sich anhand ihrer Funktionen in messenger RNA (mRNA), ribosomale RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA) und nucleare RNA (nRNA) unterteilen und dient der Übertragung von genetischen Informationen (Gassen et al., 1996).

Die RNA entsteht durch Transkription aus DNA und stellt die Arbeitsform der genetischen Information dar. Auf Grundlage der RNA erfolgt dann die Translation, die Herstellung des Proteinmoleküls, das durch den entsprechenden genetischen Code auf der DNA kodiert wird.

Bereits geringe Änderungen der Struktur der Nukleinsäuren, wie der Austausch einer einzigen Base, können zu drastischen biologischen Veränderungen führen. Zu deren Nachweis sind klassische chemische Verfahren nur bedingt geeignet. Im niedermolekularen Bereich dient zum Beispiel der Einsatz der HPLC (= High Pressure Liquid Chromatographie) zur Auftrennung von Oligonukleotiden. Für den Nachweis und die Unterscheidung spezifischer Nukleinsäuresequenzen werden vor allem Hybridisierungstechniken eingesetzt, deren höchste Entwicklungsstufe derzeit die sogenannte „Chip Technologie“ darstellt. Aufgrund einer sehr hohen räumlichen Auflösung können hiermit tausende verschiedener Nukleinsäuresequenzen gleichzeitig erfasst werden.

Andere Verfahren basieren auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die letztlich auch als Hybridisierungsverfahren mit einer hoch effizienten enzymatischen Verstärkungsreaktion (Amplifikation) verstanden werden kann. Durch diese Amplifikationsreaktion wird eine sehr hohe Empfindlichkeit erreicht, deutlich höher als es die Chip Technologie ermöglicht. Unter optimalen Bedingungen kann schon ein einziges Molekül einer bestimmten Zielsequenz nachgewiesen werden, was bei vielen Fragestellungen, wie z.B. dem Nachweis von Infektionserregern oder maligne entarteter Zellen und der Personenidentifikation in der Rechtsmedizin hervorragend genutzt werden kann.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerasekettenreaktion wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt. Die Entdeckung der PCR revolutionierte die Gentechnik, da es mittels PCR möglich ist, Nukleotidsequenzen in vitro millionenfach zu kopieren. Diese enzymatische Vervielfältigung, als Amplifikation bezeichnet, erlaubt es, geringe Mengen DNA rasch einer Analyse zugänglich zu machen (Gassen et al., 1996).

Zur Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels PCR ist es notwendig, dass der unbekannte, zu vervielfältigende DNA-Abschnitt von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt ist. Weiterhin benötigt man als Starthilfen Oligonukleotidprimer (Primer). Hierbei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu einer definierten Sequenz der DNA-Matrize, dem sogenannten „Template“ sind (Newton et al., 1994).

Beide DNA-Stränge können als Matrize für die Synthese dienen, vorausgesetzt man setzt den entsprechenden Primer zu. Verwendet man RNA, ist es notwendig vor Beginn der eigentlichen PCR mit Hilfe einer reversen Transkriptase komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren. Als Ergebnis einer PCR erhält man nach Ablauf von  $n$  Runden ein theoretisches Maximum von  $2^n$  doppelsträngigen DNA-Molekülen, die Kopien der DNA-Sequenz zwischen den Primern darstellen (Mullis et al., 1986).

Neben der DNA-Matrize (Template) und den Primern benötigt man das die DNA synthetisierende Enzym, eine DNA-Polymerase. Man bediente sich ursprünglich der *E. coli* DNA-Polymerase I zur Verlängerung der Primer. Diese Polymerase wird jedoch durch Hitze inaktiviert und muss in jedem neuen Amplifizierungsschritt neu zugesetzt werden. Vereinfacht wird das Verfahren entscheidend durch den Einsatz von hitzestabilen DNA-Polymerasen. Zu den am häufigsten verwendeten hitzestabilen DNA-Polymerasen gehört die Taq-DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, das im Wasser heißer Quellen lebt (Saiki et al., 1988; Newton et al., 1994). Sie hat ihr Temperaturoptimum bei 72 - 74°C und ist auch noch bei 94°C stabil. Durch die Hitzestabilität ist es daher ausreichend, das Enzym nur einmalig am Anfang der Reaktion zuzusetzen, die Polymerase bleibt während aller weiteren PCR-Schritte aktiv. Um über

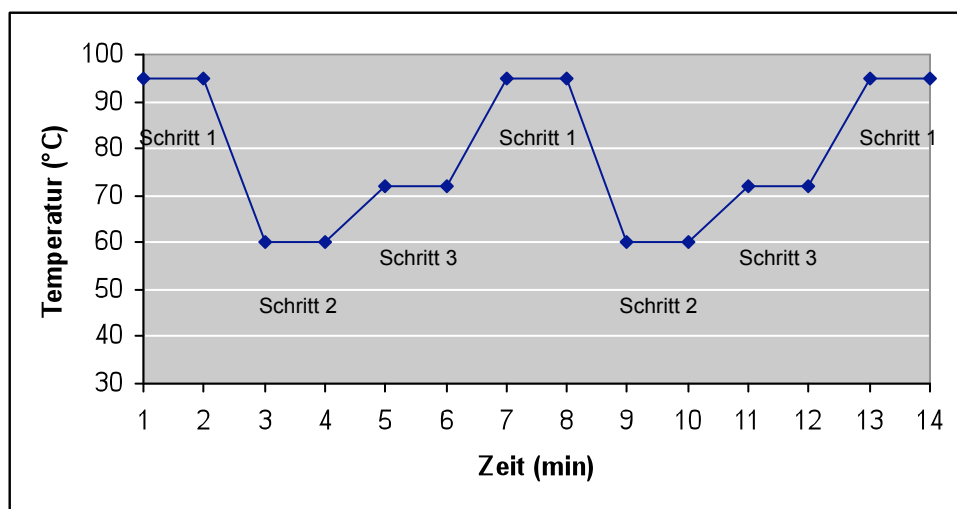
ausreichende Mengen eines qualitativ hochwertigen Enzyms verfügen zu können, wird das Gen der Taq-DNA-Polymerase kloniert, modifiziert und in *E. coli* expremiert (Amplitaq®, P.E. Applied Biosystems). Da sich die Amplitaq®-Polymerase leichter in reiner Form isolieren lässt, ist diese das Enzym der Wahl bei Durchführung der PCR. Eine weitere gentechnisch hergestellte, hitzestabile DNA-Polymerase ist die Amplitaq®-GOLD. Dieses Enzym wird erst durch einen Heißstart vor der PCR vollständig aktiviert oder kann während der PCR schrittweise aktiviert werden (Newton et al., 1994). Auf die Technik und die Vorteile des Heißstarts wird noch genauer eingegangen.

Die Fehlerquote der DNA-Polymerase liegt bei optimalen Reaktionsbedingungen bei 1 zu 80.000 und ist damit sehr gering. Allerdings ist die Fehlerquote der Polymerase von vielen Faktoren, wie zum Beispiel der Konzentration der Desoxyribonucleotidtriphosphate (dNTPs), der Magnesiumionenkonzentration, der Zykluszahl und auch der Konzentration der Polymerase abhängig (Gassen et al., 1996).

Die für eine PCR erforderliche dNTP-Konzentration liegt bei etwa 100µM, obwohl die Taq-Polymerase bei niedrigeren Konzentrationen präziser arbeitet. Die optimale dNTP-Konzentration ist jedoch von vielen Faktoren abhängig. Hierzu zählen u.a. die Magnesiumionenkonzentration, die Primerkonzentration, die Länge der DNA-Kopien und die Anzahl der PCR-Zyklen. Um die beste Konzentration zu ermitteln, sollte man unterschiedliche Testansätze mit unterschiedlichen dNTP-Konzentrationen austesten. Die notwendigen Puffer für die Taq-Polymerase sind meist in den entsprechenden Testansätzen in zehnfacher Konzentration enthalten. Bezüglich der Magnesiumionenkonzentration muss, wie auch für die dNTPs das Austesten der richtigen Konzentration in verschiedenen Testansätzen erfolgen. Die optimalen Konzentrationen liegen zwischen 0,5 bis 5,0 mM. Neben der Stimulation der Polymerase bilden die Magnesiumionen zusammen mit den dNTPs einen löslichen Komplex, der für den dNTP-Einbau ausschlaggebend ist (Newton et al., 1994). Der Ablauf der PCR gliedert sich in die in Abb. 1 dargestellten Schritte.

Hat man die Primer, welche die Startpunkte der DNA-Synthese vorgeben, die DNA-Polymerase und die Mischung der dNTPs in einem Reagenzansatz mit dem entsprechenden Template zusammengeführt, folgt als erster Schritt die Denaturierung. Der Probenansatz wird über einen definierten Zeitraum auf 94°C

erhitzt. Bei dieser Temperatur trennen sich die DNA-Stränge des Templates vollständig voneinander. Die entstandenen DNA-Einzelstränge bilden die Matrizen für die Primer und die DNA-Polymerase. Im nächsten Schritt senkt man die Temperatur, damit die Primer an die komplementären Sequenzen des Templates binden können (Annealing). Die „Annealing-Temperatur“ ( $T_m$ ) bestimmt entscheidend die Spezifität der PCR. Nachdem Primer und Matrize während der Annealingphase aneinander gebunden haben, erfolgt ein erneutes Erhitzen des Ansatzes auf 72°C, der optimalen Temperatur für die Aktivität der DNA-Polymerase. Am Ende dieser Phase, deren Länge unter anderem abhängig ist von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes, wird der Reaktionsansatz für einige Sekunden erneut auf 94°C erhöht, damit sich die neu gebildeten Doppelstränge voneinander lösen und ein neuer Zyklus beginnen kann. Nach Ablauf einer definierten Anzahl von Zyklen endet der Prozess mit einer Phase der Denaturierung. Hinzu kommen Aufheiz- und Abkühlzeiten (Mullis et al., 1986).



**Abb. 1: Der zyklische Temperaturverlauf der PCR (Newton et al., 1996)**

**Schritt 1:** In einer Lösung aus Primern, dNTPs, dem Reaktionspuffer und einer hitzebeständigen DNA-Polymerase wird die doppelsträngige DNA bei Temperaturen zwischen 93-100°C denaturiert; **Schritt 2:** Die Oligonucleotidprimer binden in Abhängigkeit der entsprechenden Temperatur  $T_m$  an die denaturierte DNA (Matrize); **Schritt 3:** Die hitzestabile DNA-Polymerase verlängert die Primer bei 72°C. Alle drei Schritte zusammen bilden einen PCR-Zyklus.

Die Geräte, die für einen zyklischen Temperaturwechsel während der PCR sorgen, sind sogenannte Thermocycler. Dieser Thermocycler besteht aus einem temperierbaren Reaktionsraum, in den die PCR-Probengefäße gestellt werden. Mit Hilfe einer automatischen Steuerung wird ein zyklisches Temperaturprogramm

geregelt. Die jeweilige Temperatur, die Zeit pro Reaktionsschritt und die Zyklenzahl sind individuell programmierbar (Gassen et al., 1996). Erst die Entwicklung dieser Thermocycler macht die Automatisierung der PCR möglich (Newton et al., 1994).

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei der PCR um eine sehr empfindliche, mit geringem Aufwand zu betreibende Methode. Sie ermöglicht es, in vitro millionenfache Kopien von bestimmten Nukleotidsequenzen herzustellen und somit auch kleine DNA-Mengen einer raschen Analyse zugänglich zu machen.

Die Anwendungsmöglichkeiten der PCR sind breit gefächert. Sie kann verwendet werden, um bekannte Sequenzabschnitte zu amplifizieren und sie so der Klonierung oder Sequenzierung zugänglich zu machen. Weiterhin wird sie verwendet, um die Anwesenheit bekannter Sequenzen nachzuweisen oder anhand bekannter Sequenzen unbekannte Bereiche gezielt zu amplifizieren. Weiterhin können markierte PCR-Produkte als Hybridisierungsproben eingesetzt werden.

Zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität der PCR kann eine so genannte nested-PCR oder geschachtelte PCR durchgeführt werden. Das Prinzip der nested-PCR basiert auf zwei ineinander verschachtelten PCR-Läufen. Aus der Zielsequenz des ersten Laufs wird in der zweiten, sog. Nested-PCR, ein Teilstück der ersten PCR-Produkte amplifiziert. Hierdurch wird einerseits die Sensitivität und Spezifität gesteigert. Die Spezifität ist höher, da nahezu alle falschen unspezifischen Kopien unberücksichtigt bleiben. Diese unspezifischen Kopien bieten den internen Primern in der zweiten PCR-Runde nicht genügend komplementäre Sequenzen und stehen daher als Matrize nicht mehr zur Verfügung. Jedoch auch diese Nested-PCR ist anfällig für Kontaminationen (Gassen et al., 1999).

Mit Hilfe der RT-PCR (Reverse-Transkriptase-PCR) können RNA-Sequenzen amplifiziert werden, wobei die RT-PCR im Vergleich zu anderen RNA-Nachweismethoden eine wesentlich größere Sensitivität aufweist. Bei Anwendung der RT-PCR haben die Amplifikationsprodukte nur eine Länge von 1-2 kb. Zurückzuführen ist dies einerseits auf die geringe Stabilität der RNA und andererseits auf die geringe Durchsatzrate der reversen Transkriptase. Wenn Gene für längere Transkripte kodieren, ist es notwendig, von der herkömmlichen RT-PCR abzuweichen und eine Marathon-PCR durchzuführen. Hierbei erfolgt



zuerst die Durchführung zweier getrennter RT-PCRs. Die beiden entstehenden Produkte überschneiden sich über eine Länge von 20-100 bp. Im zweiten Schritt führt man eine PCR mit den beiden äußeren Primern der ersten Ansätze und den Produkten des ersten Laufes eine neue PCR durch. Auch die Vervielfältigung unbekannter DNA-Sequenzen, ausgehend von einem kurzen Bereich mit bekannter Sequenz, sind mit Hilfe der PCR möglich (RACE-PCR = rapid amplification of cDNA ends-PCR, inverse PCR) (Gassen et al., 1999).

Es können nicht beliebig lange DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Bei einer Länge der Amplifikationsprodukte von 2-4 kb ist die Grenze der konventionellen Taq-Polymerase erreicht. Ursache hierfür sind frühe Strangabbrüche, ausgelöst durch falsch eingebaute Basen. Es wurden mittlerweile Techniken etabliert, die Amplifikationsprodukte mit Längen bis 40 kb vervielfältigen. Bei der sogenannten Long-Range-PCR findet eine Mischung aus zwei thermostabilen DNA-Polymerasen Anwendung. Neben einer Taq-Polymerase enthält der Ansatz eine „Proofreading“-Polymerase. Diese korrigiert von der Taq-Polymerase falsch eingebaute Basen und verhindert somit den vorzeitigen Abbruch der synthetisierten DNA. Bei vielen Fragestellungen ist es sinnvoll, Transkripte in der Zelle oder im Gewebe selbst zu bestimmen. Die hier anwendbare In-Situ-Hybridisierung ist häufig jedoch nicht empfindlich genug. Abhilfe schafft die In-Situ-PCR. Die DNA oder RNA in der Zelle dienen den Primern als Matrize für die PCR. Die Durchführung der PCR erfolgt direkt in den auf Objektträgern fixierten Gewebeschnitten. Man benötigt dementsprechend speziell konstruierte Thermocycler. Über radioaktive und nicht radioaktive Detektionssysteme erfolgt die Lokalisation der Amplifikationsprodukte (Gassen et al., 1999).

Dient die PCR nur dem Nachweis eines bestimmten DNA-Abschnittes, spricht man von einer qualitativen PCR. Es reicht hierbei in der Regel ein einziges DNA-Molekül im Ansatz aus, um einen Nachweis zu erbringen. Die qualitative PCR ist daher eine sehr empfindliche Methode. Sie wird unter anderem dafür verwendet, Krankheitserreger aus einer Probe oder Personen in der Gerichtsmedizin zu identifizieren. Bei der Suche nach Krankheitserregern ersetzt die qualitative PCR die üblichen immunologischen Methoden immer öfter. Von Vorteil ist hier, dass Krankheitserreger mit teilweise bekanntem Genom schon nachgewiesen werden können, wenn von Seiten des betroffenen Patienten noch keine Antikörperbildung erfolgt ist. Weiterhin ermöglicht die Erregersuche mittels qualitativer PCR den

Erregernachweis auch bei bereits vorhandenen Antikörpern und erlaubt somit die Identifizierung einer Neuerkrankung (Fa. Roche, PCR: Eine ausgezeichnete Methode, 2003).

Die Methode ermöglicht nach Ablauf einer bestimmten Anzahl von Zyklen, in der sich die PCR-Produkte exponentiell vermehren, prinzipiell auch deren quantitative Bestimmung. Man kann von der Menge der Produkte somit auf die Menge der eingesetzten Matrize schließen (Gassen et al., 1996). Bei etwa  $10^8$  Amplikonkopien erreicht die PCR dann jedoch ein Plateau (Newton et al., 1994). Ursache für das Erreichen dieses Plateaus im Anschluss an die exponentielle Phase der PCR ist zum einen das Nachlassen der Enzymaktivität. Zum anderen hybridisieren die neuen DNA-Abschnitte teilweise nicht mehr mit den Primern, sondern mit sich selbst (Wilfingseder et al., 2002).

Eine Möglichkeit quantitative Aussagen treffen zu können, ist die Messung paralleler Kontrollproben in getrennten oder den gleichen Reaktionsgefäßen, um kontrollieren zu können, dass sich die PCR-Reaktion noch im Bereich der exponentiellen Vermehrung befindet. Dabei müssen sich die Kontrollprobe und die Ziel-DNA ähneln und mit ähnlich strukturierten Primern amplifiziert werden können (Newton et al., 1994).

Der Nachweis, die Identifizierung und die Quantifizierung der PCR-Produkte sind mit Hilfe vieler unterschiedlicher Methoden möglich. Hierzu zählen unter anderem die Gelelektrophorese, Hybridisierungstechniken wie der Southern-Blot oder der Nachweis der Amplikons in Echtzeit, zum Beispiel mittels lumineszenzoptischer Produktdetektion (Heid et al., 1996).

Die einfachste Methode zum Nachweis eines PCR-Produktes ist die Gelelektrophorese. Eine kleine Menge der PCR wird auf ein Agarose- oder Polyacrylamidgel aufgetragen, im elektrischen Feld aufgetrennt und die Banden anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff, zum Beispiel Ethidiumbromid, gefärbt. Dieser wird unter Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar. Durch die Fotografie des Gels können die Ergebnisse dokumentiert werden. Zur Identifizierung des Amplikons trennt man neben den PCR-Produkten einen Größenmarker und bekannte, vorher bestimmte Kontrollprodukte auf (Newton et al., 1994).

Beim Southern-Blot folgt der Auftrennung der PCR-Produkte im Gel das Transferieren, Fixieren und Hybridisieren mit spezifischen, radioaktiven oder nicht radioaktiven Sonden auf einen Filter (Gassen et al., 1999).

Diese Nachweismethoden erfordern jedoch weiterhin einen enormen Zeit- und Arbeitsaufwand. Der Southern-Blot beinhaltet zum Beispiel mehrere Wasch- und Fixierungsschritte und ist daher auch anfälliger gegenüber Verunreinigungen.

Die Nachweise der Amplikons in Echtzeit stellen in diesem Zusammenhang eine deutliche Weiterentwicklung der PCR dar. Hierbei erfolgen die Amplifizierung und der Nachweis der PCR-Produkte in einem Reagenzgefäß. Diese sogenannte Real-Time-PCR wurde erstmals 1991 von Holland et al. (1991) beschrieben.

## **2.2 Störfaktoren der Polymerase-Kettenreaktion**

Die häufigsten Probleme bei Durchführung einer PCR sind keine Produktbildung, unspezifische Nebenprodukte und Kontaminationen (Gassen et al., 1999).

Die dNTP-Konzentration, die Zusammensetzung des verwendeten Puffers und die Magnesiumionenkonzentration haben Auswirkungen auf das Gelingen einer PCR und sollten daher ausgetestet werden. In Abhängigkeit vom verwendeten biologischen Material finden sich verschiedene Hemmstoffe im Testansatz einer PCR. Die DNA-Extraktionsmethoden, anwendbar für die Extraktion aus beliebigen Proben, enthalten unterschiedliche Detergentien zur Zellyse und Denaturierung. Nichtionische Detergenzien hemmen die PCR nicht bis zu einer Konzentration von 5%, ionische Detergenzien jedoch schon in extrem niedrigen Konzentrationen. Daher sollten diese beispielsweise durch eine Phenolextraktion mit anschließender Ethanolfällung entfernt werden. Ebenso entfernt werden muss das Enzym Proteinase K, das bei vielen DNA-Extraktionsmethoden verwendet wird, da die Taq-Polymerase gegenüber Proteasen empfindlich ist. Eine der Hauptvoraussetzung für eine ausreichende Produktbildung ist neben dem Einsatz einer qualitativ guten DNA-Matrize, die Auswahl passender Primer. Die Primer sind in der Regel 20-30 Nukleotide lang. Sie sollten, wenn möglich, alle 4 Basen (Adenosin, Thymin, Cytosin, Guanin) gleich häufig enthalten. Weiterhin sollten Primer an ihrem 3'Ende weder inter- noch intramolekular komplementär sein, um die Bildung von Primerdimeren (PDs) zu vermeiden (Newton et al., 1994).

Da Primer in hohen Konzentrationen im PCR-Ansatz vorkommen, sind Interaktionen untereinander leicht möglich. Bei einem zueinander komplementären Nukleotid am 3'Ende der beiden einzusetzenden Primer kann die Anzahl der Primerdimere bereits nach 30 Zyklen ansteigen. Fehlt dieses komplementäre

Nukleotid, tritt der negative Effekt der Primerdimerbildung bei ansonsten identischen Reaktionsbedingungen erst 10 Zyklen später ein (Brownie et al., 1997). Ein weiterer Faktor, der unabhängig vom Design der Primer zur Bildung von Primerdimeren führen kann, ist die Durchführung einer PCR unter Kaltstartbedingungen (Ferrie et al., 1992). Zur Vermeidung der Bildung von Primerdimeren sollten daher die verwendeten Primer vorsichtig ausgewählt werden. Die Verwendung des „hot-starts“ (D'Aquila et al., 1991) oder die Durchführung der „Touchdown“-PCR dient ebenfalls zur Verringerung der Bildung möglicher Primerdimere (Don et al., 1991), ebenso die Anwendung modifizierter Enzyme, wie zum Beispiel die AmpliTaq<sup>®</sup> Gold DNA Polymerase (Brownie et al., 1997).

Bei einem Verfahren der sogenannten „Hot Start“ PCR sind essentielle Komponenten für die Aktivität der Polymerase von der Reaktion zunächst getrennt und werden erst nach Erreichen einer gewissen Temperatur, der optimalen Annealingtemperatur der Primer, zugesetzt oder im Reaktionsansatz freigesetzt. Da die Polymerase in dem zuvor inkompletten Reaktionsansatz nicht arbeiten kann, entstehen während der ersten noch von der umgebenden Raumtemperatur ausgehenden Aufheizphase keine unspezifischen Produkte (Steffen et al., 1999). Auch bei der „Touchdown“-PCR werden die Reaktionstemperaturen optimal abgestimmt (Don et al., 1991). Die AmpliTaq<sup>®</sup> Gold DNA Polymerase wurde chemisch so modifiziert, dass sie erst nach Erreichen einer bestimmten Temperatur aktiv wird. Bei Raumtemperatur zu einem Testansatz zugegeben kann sie daher keine Primerdimere amplifizieren (Moretti et al., 1998).

Neben all diesen genannten Punkten spielt die richtige Wahl der Annealing-Temperatur eine Rolle bei der Durchführung einer effizienten PCR. Die zur Berechnung der Annealing-Temperatur vorhandene Formel

$$(\text{Anzahl A+T}) \times 2^{\circ}\text{C} + (\text{Anzahl G+C}) \times 4^{\circ}\text{C}$$

ist jedoch bei Primerlängen über 20 Nukleotide ungenau. Die idealen Temperaturen liegen 3-12°C über den so berechneten (Newton et al., 1994). Computerprogramm wie das von uns verwendete OMIGA (Oxford Molecular) können die sich aus einer bestimmten Primersequenz ergebenden optimalen Annealingtemperaturen auch bei Primerlängen über 20 Nukleotiden sehr genau

berechnen. Ist die Annealing-Temperatur zu niedrig, werden unspezifische DNA-Abschnitte amplifiziert. Bei zu hohen Temperaturen ist einerseits die Ausbeute an erhaltenem PCR-Produkt und andererseits die Reinheit des Produktes reduziert, da die Anlagerung der Primer an der Zielsequenz nicht ausreichend ist (Rychlik et al., 1990). In solchen Fällen ist es sinnvoll, die Annealing-Temperatur der Primer zu variieren, um eventuelle Fehlpaarungen zu minimieren.

Komplementäre Regionen innerhalb der Templates können ebenfalls Probleme bei der Durchführung der PCR bedingen. Die Bildung sogenannter „hair-pins“ und anderer Strukturen stören die reguläre Verlängerung des Templates (Kubista et al., 2006).

Potentielle Ursachen für Verunreinigungen sind vielfältig. Neben der Art der Probe, der Methode der Probenentnahme, der Laborausstattung, der Sauberkeit des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmaterialien gibt es viele weitere Faktoren, die eine Verunreinigung verursachen können. Eine Negativkontrolle ist bei jedem Probenansatz unerlässlich. Auch Positivkontrollen durch charakterisierte Proben können wichtig sein. Um Verunreinigungen zu vermeiden, müssen Einrichtungen und Reagenzien für die PCR getrennt von anderer Laborausrüstung aufbewahrt werden. Materialien, die autoklavierbar sind, sollten im Autoklaven sterilisiert werden. Reagenzien lagert man in kleinen Mengen auf Vorrat, um die Kontamination großer Mengen zu vermeiden (Newton et al., 1994).

Zur Vermeidung der Kontamination neuer Reaktionsansätze durch Übertragung alter PCR-Produkte empfiehlt sich die Verwendung von dUTP statt dTTP. Befindet sich in allen PCR-Produkten dieses Nukleotid und wird folgenden Reaktionen eine Uracil-N-Glykosylase (UNG) zugesetzt, so kann man eine Zerstörung von PCR-Produkten vorausgehender Reaktionsansätze erreichen, da die UNG die Hydrolyse uracilhaltiger Nukleinsäuren katalysiert und somit die Übertragung früherer dUTP-haltiger PCR-Produkte auf neue Testansätze vermieden wird (Longo et al., 1990).

Eine weitere Methode zur Dekontamination der Reagenzgefäße ist die Bestrahlung der PCR-Gefäße mit UV-Licht. Diese zerstört DNA in den Reagenzgefäßen und verhindert somit eine Kontamination des Testansatzes (Sarkar et al., 1991).

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass viele Faktoren die Effektivität und Spezifität der PCR beeinflussen. Jede einzelne Komponente der Reaktion kann

Ursache für ein schlechtes PCR-Ergebnis sein. Daher ist es notwendig, die PCR zu standardisieren. Es sind Kontrollansätze für jede PCR dringend erforderlich, um mögliche Kontaminationen zu erkennen. Beachtet man alle notwendigen Vorsichtsmaßnahmen und versucht mögliche Fehlbestimmungen durch eine Standardisierung der Methode zu verhindern, handelt es sich bei der PCR um eine sehr empfindliche, mit geringen Aufwand zu betreibende Methode, die auch in der Routinediagnostik ohne weiteres durchführbar ist.

### **2.3 Die Realtime-Polymerase-Kettenreaktion**

Die von Kary Mullis 1987 entdeckte Polymerasekettenreaktion revolutionierte die medizinische Forschung. Ein weiterer enormer material- und zeitsparender Fortschritt ist die Weiterentwicklung der Methode zur „Echtzeit-PCR“ (Realtime-PCR). Hierdurch werden die Amplifikation der Probe und die gleichzeitige Sichtbarmachung der Vervielfältigung in einem Ansatz ohne Nachbearbeitung und aufwändige Nachweismethoden wie Gelelektrophorese oder Southern-Blots möglich.

Higuchi et al. (1992) zeigen, dass durch die Zugabe von Ethidiumbromid zum Testansatz ein Nachweis der vervielfältigten Probe auch ohne Öffnen des Testansatzes möglich ist, da die Intensität der Fluoreszenz von Ethidiumbromid unter Bestrahlung mit UV-Licht nach dem Einbau in Doppelstrang-DNA ansteigt. Dieser Fluoreszenzanstieg kann kontinuierlich gemessen werden und gibt Aufschluss über die Amplifikation der Probe. Die Kinetik der Messung lässt auf die Anzahl der DNA vor Beginn der Reaktion schließen (Higuchi et al., 1993). Diese Art der Produktdetektion vereinfacht den Prozess der PCR und ermöglicht es, viele Proben in rascher Folge zu untersuchen (Higuchi et al., 1992).

Die Realtime Detektionssysteme bestehen aus einem Thermocycler und einem optischen Detektionssystem. Nach jedem Zyklus werden die Fluoreszenzwerte gemessen und mittels einer geeigneten Computersoftware ausgewertet. Die Anregung der Fluorophore erfolgt je nach System mit Halogen-, LED oder Laserlicht (Wilfingseder et al., 2002).

Unter Ausnutzung der 5' → 3' Exonuclease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase gelang 1991 erstmals die Amplifizierung und gleichzeitige Detektion des PCR-Produkts mit <sup>32</sup>P-markierten Sonden. Der Zusatz einer Oligonucleotid-Probe (sog.

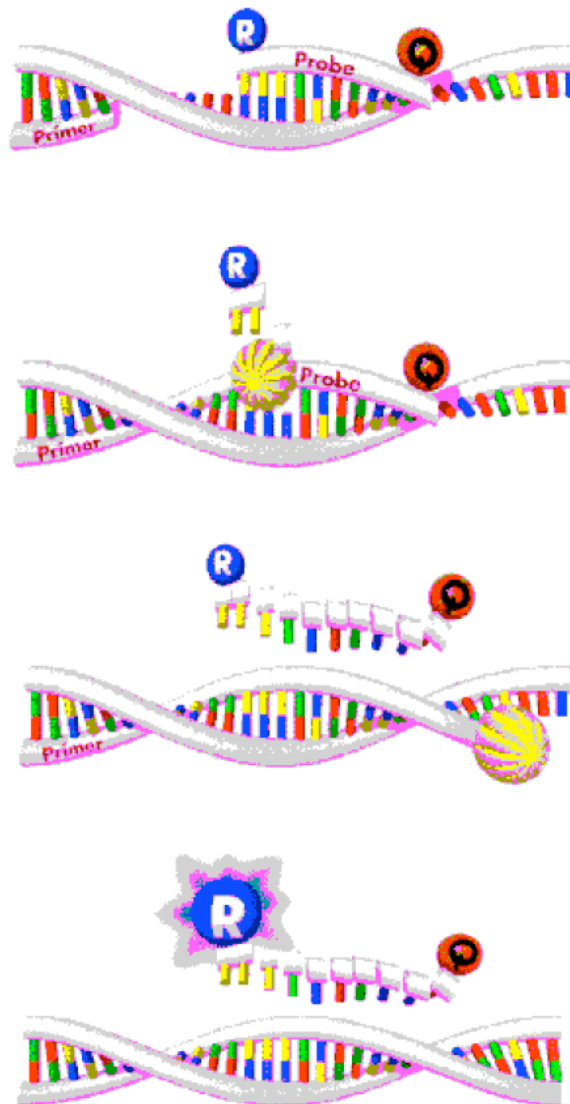
Sonde) stört die Amplifizierung des spezifischen Produktes im PCR-Ansatz nicht und die Oligonucleotide werden nur nach Hybridisierung mit der Zielsequenz gespalten. Die Methode macht jedoch weiterhin ein aufwendiges Post-PCR-Processing zur Trennung intakter Sonden von gespaltenen Sonden notwendig (Holland et al., 1991).

Zwei Jahre später folgte die Einführung mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter Sonden. Die Entwicklung dieser sog. fluorogenen Sonden (TaqMan-Sonden) ermöglicht die Detektion der abgebauten Sonde ohne aufwendiges Post-PCR-Processing (Lee et al., 1993). Mit dem von der Firma Applied Biosystems entwickelten Sequence Detector ABI PRISM™ 7700 oder dem Light Cycler der Firma Roche ist die Messung dieser Fluoreszenzen in einem geschlossenen System möglich.

Der TaqMan™ PCR Assay der Firma Applied Biosystems macht sich die 5'→ 3' Exonucleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase folgendermaßen zu nutzen. Die Polymerase bindet am 5'-Ende von Doppelstrang-DNA (dsDNA) und verursacht die Spaltung des DNA-Stranges in 5'→ 3' Richtung in Mono- und Oligonucleotide. Die dort verwendete spezielle Sonde ist an ihrem 5'-Ende mit einem „Reporter“- (Fluoreszein-Derivat) und an ihrem 3'-Ende mit einem „Quenscher“-Farbstoff (Rhodaminderivat) markiert. Zusätzlich ist das 3'-Ende mit einem Phosphatrest blockiert, um eine Verlängerung des 3'Endes während der PCR zu vermeiden. Nach Bindung der Sonde an die zu amplifizierende nach der Hitzedenaturierung einzelsträngigen Zielsequenz und Anregung der intakten Sonde durch Licht einer spezifische Wellenlänge, wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quenscher durch den so genannten Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) unterdrückt (Lee et al., 1993). Bei dem FRET handelt es sich um einen spektroskopischen Prozess, bei dem Energie durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Molekülen mit überlappenden Emissions- und Absorptionsspektren übertragen wird (Stryer et al., 1967). Wird die Sonde nun im Verlauf der Reaktion durch die Taq-Polymerase geschnitten, verliert der Quenscher-Farbstoff die Nähe zum Reporter-Farbstoff und die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes steigt an. Da nur die Sonden gespalten werden, die auch sicher an der spezifischen Sequenz gebunden haben, ist das Signal sequenzspezifisch (Lee et al., 1993). Die Effizienz des FRET ist dabei umgekehrt

proportional zur 6. Potenz des Abstandes der beiden Farbstoffe (Higuchi et al., 1993).

Die Abbildung 2 zeigt schematisch den Einfluss der 5'→3' Exonuclease Aktivität der AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase auf eine Fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan<sup>™</sup> PCR.



1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer.

2. Primer-Extension und Sondenhydrolyse.

3. PCR-Produkt wird vollständig synthetisiert, die Farbstoffe werden getrennt.

4. In Abhängigkeit von der Zahl der freigesetzten Reportermoleküle wächst das Reporter-Signal.

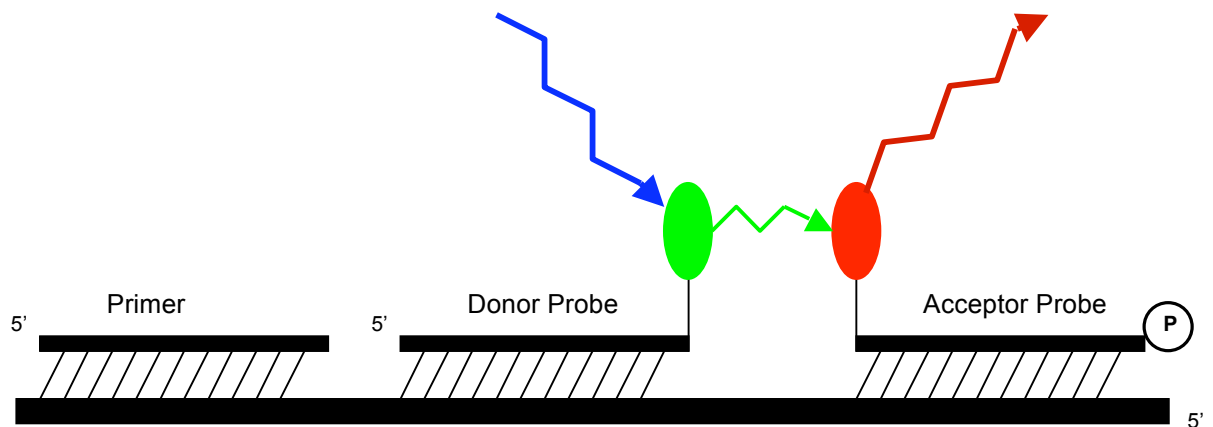
**Abb. 2:** Einfluss der 5' → 3' Exonuclease Aktivität der AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase auf eine fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan<sup>™</sup> PCR (Schild et al., 1996)

Für das System der TaqMan<sup>™</sup>-PCR stehen mehrere Reporter-Farbstoffe wie 6-Carboxyfluorescein (FAM), Tetrachloro-6-carboxyfluorescein (TET), Hexachloro-6-carboxyfluorescein (HEX) oder VIC<sup>®</sup> zur Verfügung (Arya et al., 2005). Weitere Reporterfarbstoffe sind 2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein (JOE)



und 6-Carboxy-X-rhodamin (ROX) (Schild et al., 1996). Als Quenscher dienen 6-Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) oder 4-(Dimethylaminoazo)benzene-4-Carboxylsäure (DABCYL) (Arya et al., 2005).

Beim Light Cycler der Firma Roche arbeitet man mit zwei Oligonucleotiden. Eines markiert mit fluoreszierendem Farbstoff am 3'Ende, ein zweites Oligonucleotid markiert am 5'Ende. Die Oligonucleotide binden an die Zielsequenz und durch die Nähe zueinander wird eine messbare Fluoreszenz frei. Diese wird während der Annealing-Phase der Reaktion gemessen (Kreuzer et al., 1999). Auch hierbei wird die Freisetzung der messbaren Fluoreszenz ausgelöst durch den sogenannten Fluoreszenz-Energietransfer. Der Donor-Farbstoff transferiert Energie auf den Akzeptor-Farbstoff der zweiten Sonde und bewirkt so die Freisetzung der Fluoreszenz einer bestimmten Wellenlänge. Freigesetzt wird diese aber nur, wenn beide Sonden an der korrekten Sequenz des Templates binden. Die gemessene Fluoreszenz steigt auch hier proportional zu der synthetisierten DNA-Menge während der PCR (Arya et al., 2005). In Abbildung 3 wird diese Sondentechnik des Light Cycler schematisch dargestellt.



**Abb. 3: Sondentechnik Light Cycler**

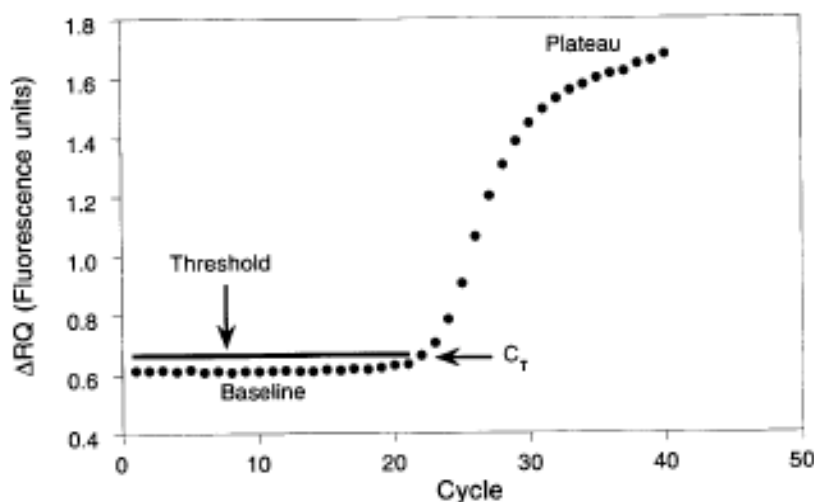
Hybridisierungsproben produzieren messbare Fluoreszenzen, wenn beide Proben nebeneinander an eine einsträngige DNA-Matrize binden. Der Energietransfer erfolgt von der Donor-Fluorophore zur Akzeptor-Fluorophore mittels Fluoreszenz Energietransfer. (Caplin et al., 1999)

Vergleiche der beiden Detektoren, dem ABI PRISM<sup>TM</sup> 7700 und dem Light Cycler zeigen, dass beide Systeme sehr gut zur raschen und präzisen Analyse von PCR-Produkten geeignet sind (Nitsche et al., 1999).

## 2.4 Quantitative PCR mit lumineszenzoptischer Produktdetektion

Mit Entwicklung der Realtime-PCR ist eine Amplifikation der Probe und das gleichzeitige Sichtbarmachen der Vervielfältigung in einem Ansatz ohne Nachbearbeitung und aufwändige Nachweismethoden möglich. Um nun noch die Menge des entstehenden Produktes genau zu bestimmen, muss die quantitative Messung des PCR-Produktes in der logarithmischen Phase der PCR erfolgen (Kellogg et al., 1990).

Werden bei der Realtime-PCR die mit Reporter- und Quenscher-Farbstoff markierten Sonden im Rahmen der PCR hydrolysiert, trennen sich die interferierenden Farbstoffe voneinander. Die Emission des Reporterfarbstoffes steigt an. Da für jedes amplifizierte Produkt ein Fluorophor frei wird, ist die Zunahme der messbaren Strahlung direkt proportional zur Menge der amplifizierten Sequenzen. Während die Intensität der frei werdenden Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes ( $R_{n+}$ ) steigt, ändert sich die Quenscher-Farbstoffintensität ( $R_{n-}$ ) fast nicht. Die Intensität des Quenscher-Farbstoffes dient als interner Standard. Um Verfälschungen der Ergebnisse zu vermeiden, wird die Emission des Reporterfarbstoffes je Zyklus durch die Referenzfarbstoffemission (Quenscher) dividiert. Dieses  $\Delta R_n$  wird in jedem PCR-Zyklus berechnet und gegen die Zykluszahl aufgetragen. Die Zykluszahl, bei der  $\Delta R_n$  einen vorgewählten Schwellenwert (Threshold) überschreitet, wird als  $C_T$  (Threshold Cycle) bezeichnet, siehe Abb. 4 (Heid et al., 1996).



**Abb. 4: PCR-Amplifikationsschema**

zur Darstellung der Zykluszahl  $C_T$ , bei der die Reporterfluoreszenz  $R_{n+}$  die Hintergrundfluoreszenz  $R_{n-}$  übersteigt. Der Threshold ist der vorgewählte Schwellenwert (Heid et al., 1996).

Mit einer Referenzprobe werden  $C_T$ -Werte steigender Konzentrationen gemessen und eine Standardkurve erstellt. Mit deren Hilfe kann die absolute Kopienzahl der untersuchten Probe und somit die Ausgangsmenge des Templates ermittelt werden (Gibson et al., 1996).

Da mit der Realtime-PCR eine genaue Quantifizierung von Proben möglich ist, hat diese Methode rasch ihren Stellenwert in der Forschung gefunden. Aber auch die Anwendung in der Routinediagnostik ist möglich (Bar et al., 2003).

## 2.5 Die Multiplex-PCR

Kombiniert man verschiedene Primerpaare in einem PCR-Ansatz und amplifiziert mehrere Matrizen, spricht man von einer sogenannten Multiplex-PCR (Newton et al., 1994). Die Planung und Durchführung der Multiplex-PCR ist gegenüber einem singulären PCR-Ansatz zur Amplifikation nur einer einzelnen Zielsequenz deutlich schwieriger, da die verschiedenen Produkte der PCR-Reaktion akkumulieren und um das vorhandene Probenreagenz konkurrieren. Um diesen Konkurrenzeffekt weitgehend auszuschalten, müssen die Konzentration der Primer auf ein Minimum reduziert und die zueinander komplementären Sequenzabschnitte der verschiedenen Primer und Zielsequenzen so gering wie möglich sein (Kubista et al., 2006). Weiterhin sollten alle in einem Ansatz verwendeten Primer die gleiche Länge und Annealing-Temperatur haben.

Eine weitere Methode zur Verringerung bzw. Vermeidung der Bildung von Primerdimeren ist die HANDS („**H**omo-**T**ag-**A**ssisted-**N**on-**D**imer-**S**ystem“) -PCR. Die bei der HANDS-PCR verwendeten Primer erhalten an ihrem 5' Ende zusätzlich angefügte Sequenzen, ein sogenanntes „Homo-Tail“. Diese Sequenz kann frei gewählt werden, muss jedoch bei allen im Ansatz verwendeten Primern die gleiche Sequenz haben und sollen eine etwas höhere Schmelztemperatur als die spezifische Sequenz des Primers aufweisen. Die HANDS-PCR verringert die Bildung von Primerdimeren um mehrere Zehnerpotenzen (Brownie et al., 1997).

Eines der häufigsten Probleme der Multiplex-PCR ist die Kontamination von Proben und Reagenzien mit amplifizierten Sequenzen. Dies führt zu falsch-positiven Ergebnissen. Erkannt werden kann dies durch den Einsatz von Negativkontrollen für jede verwendete Primerkombination. Die Multiplex-PCR führt neben dem Einsparen wichtiger Probenmaterialien, dem Einsparen von Reagenzien und

der Reduktion falsch negativer Ergebnisse auch zu einer Zeitersparnis (Burgart et al., 1992).

Neben der Anwendung in der Routinediagnostik, zum Beispiel zur Differenzierung unterschiedlicher viraler Krankheitserreger im Liquor von Patienten mit unklaren Meningitiden (Zambrano et al., 2006), ist auch ein Einsatz in der Forschung zum Nachweis von Varianten des Hämochromatose Gens beschrieben (Bernard et al., 1998).

Bei Erkrankungen wie der Muskeldystrophie Duchenne, wo sehr heterogene Mutationen und auch neue Mutationen vorliegen, ermöglicht der Einsatz der Multiplex-PCR in der pränatalen Diagnostik die Detektion von etwa 70% aller bekannten Gendelektionen (Chamberlain et al., 1988).

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die im Kindesalter am häufigsten auftretende Leukämie. Die nachweisbaren chromosomalen Rearrangements spielen eine wichtige Rolle bei der Identifizierung klinisch relevanter Untergruppen. Mit Hilfe der Multiplex-PCR ist eine rasche Analyse bekannter Rearrangements möglich und somit eine schnellere Eingruppierung in eine entsprechende Risikogruppe (Viehmann et al., 1999).

Das Vorhandensein von mehreren Reporterfarbstoffen bei der Realtime-PCR macht auch hier die Durchführung einer Multiplex-PCR möglich. Es werden mehrere fluorogene Sonden zur Diskriminierung unterschiedlicher Amplikons in einem Testansatz verwendet. Auch hier sind die Vorteile der Multiplex-Realtime-PCR die Möglichkeit der Bereitstellung interner Kontrollen, geringer Reagenzkosten und der sparsame Einsatz kostbaren Probenmaterials. Hauptbegrenzungsfaktor der Methode ist die Anzahl der vorhandenen fluorogenen Sonden, die Emission der Fluoreszenz ausgehend von den verwendeten Quencherfarbstoffen und die monochromatische Lichtquelle in den Geräten zur Durchführung der Realtime-PCR (Arya et al., 2005).

## **2.6 Mögliche Anwendungen unterschiedlicher PCR-Formen und ihre Bedeutung**

Die PCR, deren Erfinder Kary Mullis im Jahr 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt, hat die molekulargenetische Diagnostik revolutioniert und zusammen mit anderen molekularbiologischen Entwicklungen, wie hocheffizienter automatisierter

DNA-Sequenzierungstechniken, Verfahren zur Klonierung großer DNA-Fragmente- und Fluoreszenz-Hybridisierungstechniken die Entschlüsselung der menschlichen DNA im internationalen „Human-Genome-Project“ ermöglicht. In den folgenden beiden Kapiteln werden Anwendungsbeispiele aus der infektiologischen Diagnostik und der molekulargenetischen Diagnostik bei Leukämien beschrieben.

### **2.6.1 Diagnostik von Infektionen mittels Polymerase-Kettenreaktion**

Die qualitative PCR, die alleine dem Nachweis eines bestimmten DNA-Abschnittes dient, kommt noch heute dort zum Einsatz, wo die genaue Abfolge von Genabschnitten bestimmt wird. Bei der Suche nach Krankheitserregern zum Beispiel ist die PCR den üblichen immunologischen Methoden, dem Nachweis spezifischer Antikörper, in vielen Bereichen überlegen, da sie den Nachweis des Erregers bzw. dessen Erbgut noch vor der Entstehung der spezifischen Antikörper erbringen kann. Auch die Differenzierung von florider Infektion zu ausgeheilter Infektion wird möglich (Steffen et al., 1999).

Für die Anwendung der PCR in der Infektionsdiagnostik ist ausschlaggebend, wie viel von der Sequenz eines Krankheitserregers bereits bekannt ist, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Die PCR macht es möglich, auch Erreger nachzuweisen, die kaum oder nur mit viel Mühe und Zeitaufwand kultivierbar sind, da man eine einzelne Zelle oder ein Virus nachweisen kann (Newton et al., 1994). Für den alleinigen Nachweis eines Erregers im Probenmaterial reicht zunächst die qualitative PCR aus, um jedoch eine Aussage über das Fortschreiten der Erkrankung oder für die Wahl der richtigen Therapie machen zu können, ist die Kenntnis der Anzahl der Erreger von Bedeutung. Dies betrifft vor allem chronisch verlaufende Virusinfektionen wie HIV-Infektionen, CMV-Infektionen oder Hepatitis C-Virusinfektionen (Steffen et al., 1999). Die Kombination aus qualitativer und semiquantitativer PCR zum Nachweis von CMV-Infektionen bei Lebertransplantierten ermöglicht die genaue Einschätzung, wann das Risiko von CMV-assoziierten Erkrankungen erhöht ist und wann damit eine Therapie erforderlich ist (Evans et al., 1998). Auch bei der Kontrolle der HIV-positiven Patienten kann die quantitative PCR eine Virusvermehrung nachweisen und zeitlich optimierte Therapien gewährleisten (Steffen et al., 1999).

Die Diagnostik akuter Meningitiden und Enzephalopathien erfolgt auch noch heute mittels Mikroskopie von entnommenem Liquor, Bestimmung der Zellzahl, des Eiweißgehaltes und des Quotienten aus Glukosekonzentration im Blut und Konzentration im Liquor. Diese Art der Diagnostik ist zwar schnell, jedoch unspezifisch und wenig sensitiv. Das Anlegen einer Kultur und deren Auswertung benötigt mindestens 12 bis 24 Stunden und kann bei vorheriger antibiotischer Therapie oder zu langer Transportzeit ein falsch-negatives Ergebnis erbringen. Die etablierten immunologischen Methoden zum Nachweis von Antigenen sind nicht alle sensitiv genug, um in der therapeutisch entscheidenden Anfangsphase der Erkrankung den Erregernachweis sicher zu gewährleisten. Mit Hilfe der PCR steht hier eine schnelle, sensitive und spezifische Methode zur Verfügung, die es innerhalb weniger Stunden ermöglicht, bakterielle von viralen Meningitiden zu differenzieren, um die nötigen Therapien einzuleiten.

Im zweiten Schritt ist es dann beispielsweise möglich mittels Multiplex-PCR *Neisserien*, *Haemophilus* und *Streptokokken* als Ursachen bakterieller Meningitiden zu unterscheiden (Radström et al., 1994). Auch die Differenzierung von *Herpes simplex* und *Varicella zoster* Viren im Liquor von Patienten mit Enzephalopathien wird mit Hilfe der PCR mit nur geringem Zeitaufwand möglich (Casas et al., 1996).

Im Hinblick auf die steigende Anzahl schwer zu behandelnder Tuberkuloseerkrankungen eröffnet auch hier die PCR Optionen zur schnellen Diagnosestellung. Mittels PCR gelingt die Unterscheidung verschiedener Tuberkuloseformen aus einfach zu gewinnenden Proben wie Blut und Urin. Es zeigt sich, dass die PCR eine höhere Sensitivität als die Kultivierung aufweist (Rebollo et al., 2006). Auch die Klassifizierung unterschiedlicher *Mykobacterium* Spezies ist möglich (Tobler et al., 2006).

Die qualitative PCR macht im Bereich der Infektionskrankheiten eine Diagnosestellung möglich, auch wenn charakteristische Symptome fehlen. Zur Beurteilung des Fortschreitens einer Krankheit, zur Einleitung der richtigen Therapie zur richtigen Zeit und zur Überprüfung des Therapieerfolgs ist jedoch die quantitative PCR weit besser geeignet (Wilfingseder et al., 2002).

### 2.6.2 Diagnostik von Leukämien mittels Polymerase-Kettenreaktion

Ein weiteres Beispiel zur Anwendung der Multiplex-PCR ist der Nachweis genetischer Veränderungen in Leukämiezellen, um die Erkrankung einer bestimmten Leukämieform zuordnen zu können. In der Vergangenheit haben mikroskopisch sichtbare Veränderungen der Chromosomen (Zytogenetik) meist den ersten Anhalt auf Mutationen gegeben. Diese Veränderungen sind Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen und schaffen die Grundlage für molekulare Charakterisierungen. Typische Veränderungen dieser Art sind die Hyperdiploidie, die bei akuten lymphatischen Leukämie (ALL) -Formen auftritt, die Monosomie 7, vorkommend bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) oder die Trisomie 12, die gehäuft mit der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) korreliert. Der Nachweis dieser Veränderungen erfolgt mittels der klassischen Zytogenetik. Bei den zytogenetisch nicht darstellbaren strukturellen Aberrationen handelt es sich um Genrearrangements, die als Folge von submikroskopischen Translokationen, Deletionen und Insertionen, sowie Punktmutationen auftreten. Beispiele hierfür sind u.a. die reziproke Translokation t(12;21) oder die Deletion des p16<sup>Ink4A</sup>-Gens bei der ALL. Diese genetischen Veränderungen können mit Hilfe verschiedener Hybridisierungsverfahren sichtbar gemacht werden. Hier angewandte Methoden sind die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder die Comparative-Genom-Hybridisierung (CGH). Die Analyse der strukturellen Aberrationen erfolgt mit Methoden, die gezielt kleine Veränderungen von DNA und mRNA analysieren können. Die wichtigsten Vertreter dieser Methoden sind der Southern-Blot, die DNA-Sequenzierung und die Polymerase-Kettenreaktion (Gutjahr et al., 1993).

Die bei Tumoren auftretenden Translokationen können unterteilt werden in spezifische und unspezifische Translokationen. Bei den spezifischen Translokationen handelt es sich um typische immer wieder in bestimmten Tumoren vorkommende Genrearrangements. Die unspezifischen Translokationen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie nur im Tumor eines Patienten auftreten. Wichtig bei der Leukämiediagnostik ist es, spezifische Translokationen zu erfassen, um dies in die Therapieplanung mit einzubeziehen. Bei der genaueren Betrachtung der Translokationen hat sich herausgestellt, dass zwei verschiedene Pathomechanismen unterschieden werden können. Zum einen kommen Gene

eines T-Zell-Rezeptors oder eines Immunglobulins neben einem Protoonkogen zum Liegen und aktivieren dieses. Ein typischer Vertreter dieser Kategorie ist die c-MYC Translokation des Burkitt-Lymphoms. Hierbei erfolgt die Anlagerung eines Gens, welches ein Immunglobulin kodiert an ein Protoonkogen. Bei der zweiten Variante kommt es als Folge der Translokation zur Bildung eines Hybridgens, welches ein „neues Protein“ kodiert, ein sogenanntes Onkoprotein. Viele dieser Proteine kodieren Transkriptionsfaktoren. Diese Variante findet sich bei der Fusion des BCR- und ABL-Gens, welches beim Philadelphia Chromosom der chronischen myeloischen Leukämie (CML) auftritt (Rabbitts et al., 1994). Bei etwa 90 % aller kindlichen akuten lymphatischen Leukämien können chromosomale Anomalien nachgewiesen werden (Gutjahr et al., 1993).

Bei der Studie chromosomaler Translokationen von hämatologischen und soliden Tumoren lassen sich drei Entstehungsprinzipien erkennen: Genetische Veränderungen führen zur Aktivierung von Protoonkogenen, stören die Signaltransduktion der Gene oder führen zu Wachstums- und Differenzierungsstörungen der Zellen. Die Kenntnisse über Produkte der Translokationen eröffnen immer neue Perspektiven für Diagnostik und Therapie, da diese Produkte tumorspezifisch sind (Rabbitts et al., 1994).

Bestimmte Translokationen sind mit einer schlechten Prognose assoziiert und machen daher eine Einstufung des Patienten in eine Hochrisikogruppe notwendig. Dies betrifft u.a. kindliche Leukämien mit den MLL/AF4 und BCR/ABL-Rearrangements (Kersey et al., 1997). Im Gegensatz zu diesen Translokationen findet sich bei der TEL/AML-Translokation meist ein exzellentes Ansprechen auf die Therapie, so dass man bei dem Vorliegen dieses genetischen Defektes von einer guten Prognose ausgehen kann (Kempski et al., 1999).

Die im Laufe der Jahre durchgeführten Studien ermöglichen eine gewisse zytogenetische Klassifikation der Leukämien. Bei den AML-Formen zeigte sich, dass die Formen mit t(8;21)- und inv16-Genrearrangements eine gute, t(15;17) Translokationen eine intermediäre und andere Formen, die zum Beispiel 11q23 Translokationen enthalten, eine schlechte Prognose haben (Biondi et al., 1996).

Bei den ALL-Formen sind Genrearrangements, die eine schlechte Prognose bedingen das Philadelphia-Chromosom oder t(9;22) der ALL (Kempski et al., 1999) und die t(4;11) Translokation (Borkhart et al., 1997). Im Gegensatz dazu geht man bei den t(12;21) Translokationen der B-Precursor ALL von einer guten



Prognose aus (Kemski et al., 1999). Ebenfalls eine gute Prognose haben B-Zell-ALL Formen mit über 50 Chromosomen (Borkhardt et al., 1997).

Die Kenntnis immer neuer Translokationen und auch die Suche nach Translokationen bei bereits behandelten Leukämien ermöglicht eine Einschätzung über die Prognose und eine Modifizierung der Therapieschemata, um hohe Heilungschancen einerseits und Nebenwirkungs- und komplikationsarme Therapien andererseits zu erzielen.

Mit Hilfe bekannter Translokationen von Leukämien wird es möglich, mit einer quantitativen PCR den Therapieerfolg zu überprüfen. Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR können einzelne Leukämiezellen unter  $10^3$  bis  $10^6$  Knochenmarkstammzellen nachgewiesen werden. Anhand dieser nachgewiesenen Leukämiezellen zu einem bestimmten Zeitpunkt der Therapie lassen sich Rückschlüsse auf den Therapieerfolg ziehen (Coustan-Smith et al., 1998). Diese sogenannte „Minimal Residual Disease“ (MRD) zu definierten Zeitpunkten ermöglichen bei den kindlichen ALL-Formen prognostische Aussagen für den weiteren Verlauf der Erkrankung. Anhand der erhobenen Befunde lassen sich Rückschlüsse bezüglich der Prognose treffen und Therapien, wenn nötig, anpassen (van Dogen et al., 1998).

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht somit nicht nur eine Zuordnung verschiedener Leukämieformen in Hochrisiko- und Niedrigrisikogruppen, sie ist auch zur Überprüfung des Therapieerfolges geeignet. Hierdurch können Therapien weiter optimiert und auch im Verlauf angepasst werden. Die Multiplex-PCR differenziert verschiedener Leukämieformen in einem Ansatz. Dies spart wertvolle Zeit und auch Probenmaterial. Unter Verwendung der Realtime-PCR liegen wichtige Ergebnisse ohne Nachbearbeitung der PCR vor. Dies führt zu einer raschen Einleitung der spezifischen Therapien entsprechend der Risikogruppen.

### 3. FRAGESTELLUNG

Fluoreszenzoptische Verfahren zur Detektion von PCR-Produkten erbringen den Nachweis von Molekülen einer DNA-Zielsequenz ohne nachfolgende aufwendige Produktanalyse. Die Messung der PCR-Produkte erfolgt mittels Aufspaltung fluorogener Sonden, die an die Zielsequenz binden. Da mehrere Sondenfarbstoffe zur Verfügung stehen und parallel detektiert werden können, ist diese Methode grundsätzlich „multiplex-fähig“.

Die Zahl der so in einer Multiplex-PCR erfassbaren Zielsequenzen entspricht zunächst der Zahl der in einem Reaktionsansatz parallel detektierbaren fluorogenen Probenfarben. Unter der Vorstellung, dass man die Sondenbindungsstelle in die Primer integriert und mehrere Primer mit der gleichen Sondenbindungsstelle ausstattet, sollte es möglich sein, nicht nur zwischen einzelnen Zielsequenzen, sondern parallel zwischen ganzen Gruppen von Zielsequenzen zu differenzieren. Dies wäre sinnvoll und ausreichend informativ, wenn eine größere Zahl von Zielsequenzen bei positivem Nachweis die gleichen Konsequenzen zur Folge hätte, beispielsweise das gleiche therapeutische Vorgehen erforderte.

Ein solches PCR-System sollte etabliert werden, um an Leukämiezellproben zwischen einer Gruppe prognostisch günstiger und einer Gruppe prognostisch ungünstiger genetischer Veränderungen unterscheiden zu können.

Dieses Ziel sollte in folgenden Schritten erreicht werden:

- I) Etablierung eines PCR-Verfahrens zur Detektion spezifischer Zielsequenzen mit Hilfe von primerintegrierten Sondenbindungsstellen (Reportersequenzen) unter Verwendung fluorogener Sonden in der TaqMan<sup>®</sup>-PCR.
- II) Auswahl geeigneter Primer zur Detektion prognostisch relevanter chromosomaler Translokationen in einem Multiplex-PCR-Ansatz.
- III) Einbau primerintegrierter Reportersequenzen in diese Primer zur parallelen Detektion einer Gruppe chromosomaler Translokationen mit guter Prognose und einer Gruppe chromosomaler Translokationen mit schlechter Prognose, wie sie bei Leukämien im Kindesalter gefunden werden.

## 4. METHODEN

### 4.1 Kultivierung der Zellen

Die zur Verfügung stehenden Zelllinien werden in RPMI-Medium (GIBCO) mit Zusatz von L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin (GIBCO) und fetalem Kälberserum (GIBCO) kultiviert. Die Bebrütung erfolgt bei 37°C unter einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Begasung.

Das Medium setzt sich wie folgt zusammen:

500 ml RPMI-Medium 1640 (GIBCO, Kat.-Nr. 42401-018)

+ 5,0 ml L-Glutamin

+ 2,5 ml Penicillin/Streptomycin, 10.000 U/ml (GIBCO, Kat.-Nr. 15145-014 )

+ 62,5 ml fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert, EG zugelassen (GIBCO, Kat.-Nr. 10108-165)

entspricht 10%igem Medium

Zur Aufrechterhaltung der Zelllinien erfolgt eine einmal wöchentliche Umsetzung in frisches Medium.

Als Beispiel eines genetischen Markers mit schlechter Prognose bei Leukämien im Kindesalter werden die Zelllinien SD1 und K562 verwendet – im Folgenden „Badies“ genannt. Als genetische Marker mit guter Prognose die Zelllinien Reh1 und Kasumi – im Folgenden „Goodies“ genannt.

Die Zelllinien SD1 und K562 zeigen beide die Translokation t(9;22), es handelt sich jedoch um zwei Splicingvarianten des BCR/ABL-Rearrangements. Bei der Zelllinie Reh1 findet sich die Translokation t(12;21) mit dem Fusionsgen TEL/AML. Kasumi zeigt die Translokation t(8;21) mit dem dazugehörigen Fusionsgen AML/ETO. Als Negativkontrolle wird die Zelllinie HL60 verwendet, diese Zelllinie besitzt keine solche detektierbare genetische Veränderung.

Da die Genabschnitte der verwendeten Translokationen innerhalb der chromosmalen DNA in sehr großen Intronbereichen liegen können, deren Größe die mit einer PCR-Reaktion amplifizierbare Fragmentlänge bei weitem übersteigt, entscheiden wir uns zur Verwendung der RNA, die vor der PCR in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden muss.

## 4.2 RNA-Extraktion

### 4.2.1 RNA-Extraktion aus Vollblut

Die Isolierung der RNA aus Vollblut wird mit dem RNeasy Blood Mini Kit von QIAGEN durchgeführt.

Die RNA-Extraktion erfolgt durch die Lysierung der Erythrozyten im ersten Schritt und die Gewinnung der Leukozyten durch Zentrifugation. Als nächstes werden die Leukozyten unter Inaktivierung der RNasen lysiert. Dieser Schritt erlaubt die Isolation intakter RNA. Im Anschluss an die Homogenisierung der Probe erfolgt die RNA-Isolation mit der Methode der Säulenchromatographie. Die RNA wird an eine Quarzgelmembran gebunden, Kontaminationen mit Ethanol herausgespült und im Anschluss erfolgt die Elution mit Wasser.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration wird mit dem Photometer Ultrospec III (Pharmacia Freiburg) durchgeführt, die Überprüfung der Qualität der RNA mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese.

### 4.2.2 RNA-Extraktion aus Zellkulturen

Die in Suspension gewachsenen Zellen werden durch Zentrifugation für 8 Minuten bei 1200 rpm pelletiert und einmal mit PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen. Die Extraktion der RNA erfolgt mit **TRIzol®-Reagenz** (GIBCO BRL). TRIzol enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat. Je  $5-10 \times 10^6$  Zellen werden dem Pellet 1 ml TRIzol-Reagenz zugegeben. Die Proben werden homogenisiert und für 5 Minuten bei 15-30°C inkubiert, um eine komplette Dissoziation von Nukleoprotein-Komplexen zu gewährleisten. Dann folgt die Zugabe von 0,2 ml Chloroform je 1 ml TRIzol-Reagenz. Die Ansätze werden für 15 Sekunden geschüttelt und weitere 2-3 Minuten bei 15-30°C inkubiert. Durch Zentrifugation - 15 Minuten mit  $12.000 \times g$  bei 2-8°C - erfolgt die Trennung in eine untere Phenolchloroform-Phase, eine Interphase und eine obere wässrige Phase. Die wässrige Phase enthält als einzige Phase die RNA. Nach Zugabe von 0,5 ml Isopropanol je 1 ml anfänglich verwendetem TRIzol zur wässrigen Phase wird der Ansatz zur Präzipitation der RNA für 10 Minuten bei 15-30°C inkubiert und weitere

10 Minuten mit maximal 12.000 x g bei 2-8°C zentrifugiert. Die präzipitierte RNA wird mit 1 ml 75%igem Ethanol je 1 ml anfänglich zur Homogenisierung benutztem TRIzol gewaschen, die Probe durch vortexen gemischt und anschließend für 5 Minuten bei nicht mehr als 7.500 x g bei 2-8°C zentrifugiert. Es folgt das Lufttrocknen der Pellets, sowie die Lösung der Proben in RNase-freiem Wasser. Bei 55-60°C für 10 Minuten werden die Ansätze zur vollständigen Lösung im Wasserbad inkubiert. Abschließend wird jeder Probe RNase-Inhibitor (Fa. Boehringer Mannheim, 2000U, Kat.Nr. 799025) in einer Konzentration von 4 U/μl zugesetzt.

Wie auch bei der RNA-Isolation aus Vollblut findet die Überprüfung der Konzentration mit dem Photometer Ultrospec III und die Qualitätsprüfung mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese statt.

### **4.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Bei der Anwendung der Agarose-Gelelektrophorese erfolgt die Auftrennung der Proben proportional zum negativen dekadischen Logarithmus ihrer Größe und abhängig von ihrer Struktur (doppelsträngig, einzelsträngig, zirkulär, RNA vs. DNA), wobei die unter den gewählten Pufferbedingungen negativen Ladungen der Phosphatgruppen die Wanderung zur Anode im elektrischen Feld vermitteln. Durch Änderung der Agarosekonzentration variiert die Porengröße der Gele. 1% Agarose entspricht einer Porengröße von ca. 150nm, durch Verringerung der Agarosekonzentration erhöht sich die Porengröße.

Zur Anfärbung der Nukleinsäuren eignet sich Ethidiumbromid. Es schiebt sich zwischen die Basen der Nukleinsäuren und erscheint nach Anregung mit UV-Licht als leuchtende Bande im sichtbaren Bereich. Diese Methode ermöglicht die Detektion von DNA-Mengen unter 5ng.

Die Lösung der Agarose (Seakem LE Fa. Biozym) erfolgt in 1 x TAE-Puffer (Tris-Azetat-EDTA-Puffer, Zusammensetzung siehe Tabelle 1) durch Aufkochen. Nach dem Abkühlen erfolgt die Zugabe von Ethidiumbromid (2mg/ml), bevor das Gel vollständig aushärtet.

Nach Lösung der Proben in Aqua dest. werden sie mit 5xAuftragspuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) versetzt und in die Geltaschen des mit Laufpuffer (1xTAE-Puffer) überschichteten Gels eingebracht. Als DNA-

Längenstandard wird der BioLadder™100 (AGS) Standard verwendet. Das Einbringen der Proben erfolgt auf der Kathodenseite des Gels, dann wird eine Spannung von 100 V angelegt.

Zur Überprüfung der RNA-Extraktion wird ein 1%iges Agarosegel verwendet, zur Überprüfung der PCR-Produkte ein 2%iges Gel.

**Tab. 1: 50 x TAE-Puffer:** Ansatz für 1000ml  
242 g Tris-HCl  
57,1 ml Eisessig  
100 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>-EDTA  
auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

**Tab. 2: Auftragspuffer:** 100 µl 50% Glycerin  
100 µl 0,4% Bromphenolblau  
10 µl 50xTAE  
290 µl Aqua bidest.

#### 4.4 Reverse Transkription

Mit der reversen Transkription wird die RNA mit Hilfe des Enzyms M-MLV-Reverse Transcriptase<sup>1</sup> (GIBCO BRL) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Der Standardansatz setzt sich wie folgt zusammen:

1,0 µg RNA in 10 µl Aqua dest.  
4,0 µl 5x First Strand buffer, 40.000 Units (GIBCO BRL, Kat.-Nr. 8025 SA)  
2,0 µl dNTP-Mix, je 10mM dATP, dGTP, dCTP, dUTP (Prime Zyme Biometra)  
1,0 µl Random primer p(dN)<sub>6</sub><sup>2</sup>, 50 Units (Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 1034731)  
1,0 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT) (GIBCO)  
2,0 µl Aqua dest.

---

<sup>1</sup> M-MLV RT = Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase

<sup>2</sup> Random Hexamere sind Hexanucleotide mit einer statistischen Basenzusammensetzung, sie können an den verschiedensten Stellen der mRNA hybridisieren und so eine cDNA-Synthese über die gesamte Länge der mRNA einleiten

Zur Denaturierung der RNA werden die Ansätze für 5 Minuten bei 65°C im Trio-Thermoblock (Biometra) inkubiert.

Nach einer Kühlung von 2 Minuten auf Eis folgt die Zugabe von:

1,0 µl RNase-Inhibitor, 40 U/µl (Boehringer Mannheim, 2.000 U, Kat.-Nr. 799025)

1,0 µl M-MLV Reverse-Transkriptase, 200 U/µl (GIBCO, Best.-Nr. 28025-013).

Es folgt ein weiterer Inkubationsschritt bei 50°C für 60 Minuten und 94°C für 2 Minuten. Die nun entstandene cDNA wird entweder sofort in einer PCR eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

#### **4.5 Reinigung von PCR-Produkten**

Zur Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen (PCR-Produkten) werden zwei verschiedene Verfahren eingesetzt und miteinander verglichen, die Reinigung mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ und mittels „Glasmilch“.

##### **4.5.1 DNA-Isolierung mit dem QIAquick PCR Purification Kit**

Die Isolierung der DNA erfolgt zum einen mit dem QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN (Kat.Nr. 28104/106). Das Kit ist geeignet zur Isolierung von PCR Produkten einer Größe von 100bp bis zu 10kb. Hierbei kann der PCR-Ansatz ohne zwischengeschaltete Vorreinigungsschritte direkt eingesetzt werden. Das Prinzip dieser Technik basiert auf der gebräuchlichen „spin-column“ Technologie mit selektiven Bindungsarealen an Quarzgel-Membranen kombiniert mit speziellen Pufferlösungen. Die DNA bindet in Abhängigkeit vom Salzgehalt der Lösung sowie deren pH-Wert an die Quarzgelmembran, während alle anderen Bestandteile der Proben die Säule ohne zu binden, passieren. Nach einem Waschschrift erfolgt die Elution der DNA mit Tris-Puffer oder Wasser

#### **4.5.2 DNA-Bandenisolierung aus Agarosegelen mit Glasmilch**

Weiterhin verwendet wird die DNA-Isolierung mit Glasmilch. Im Anschluss an eine Agarose-Gelelektrophorese werden einzelne DNA-Banden unter der UV-Lampe ausgeschnitten. Nach Zugabe des dreifachen Volumens an Natriumjodid wird für 5 Minuten bei 55-60°C im Wasserbad inkubiert. Es folgt die Inkubation im Hybridisierungssofen für 10 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur nach Zugabe von Glasmilch (1µl je 1µg DNA). Die Inkubation erzielt die Adhäsion der DNA an die feinen Glaspartikel. Nach Zentrifugation der Probe mit 7200 x g bei Raumtemperatur und Dekantierung, führt dreimaliges Waschen mit Ethanol-Mix (New Wash) zur Beseitigung der Natriumjodidlösung. Unter Zugabe von 50-100µl Aqua dest. erfolgt die erneute Inkubation für 5 Minuten bei 55°C mit anschließender Zentrifugation bei 7200 x g für 1 Minute. Die gereinigte DNA befindet sich nun im Überstand der Probe. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgt photometrisch mit dem Ultrospec III.

#### **4.6 Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine in-vitro Methode zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten, die von bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt sind. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die sogenannten Primer, finden unter optimalen Bedingungen die bekannten Sequenzen auf der zu vervielfältigenden DNA und dienen so als Ausgangspunkt für die Synthese.

Die Vermehrung erfolgt mit Hilfe einer DNA-Polymerase, die den Einzelstrang als Matrize für die Synthese des neuen, komplementären Stranges verwendet. Zur Wiederholung dieses Vorgangs erfolgt im Anschluss an diesen Zyklus die Trennung der nun gebildeten Doppelstrang-DNA durch Hitze. Nach dem Abkühlen können die Primer erneut binden. Wird die optimale Temperatur für die Polymerase nach einem Heizschritt wieder erreicht, verlängert diese die Primer. Auch die neu gebildeten DNA-Stränge dienen als Matrize, es kommt somit mit jedem Zyklus zum Anstieg der Konzentration der Zielsequenz, idealerweise einer Verdopplung.



Für die einzelnen Proben werden die Ansätze wie folgt pipettiert:

2,5 µl 10xPuffer mit MgCl<sub>2</sub>  
2,5 µl Forward-Primer 250 nM Endkonzentration  
2,5 µl Reverse-Primer 250 nM Endkonzentration  
0,5 µl dNTP-Mix  
0,125 µl Ampli-Taq<sup>®</sup> Gold Polymerase  
Aqua dest.  
0,5 µl Template (DNA)

Die Thermo-Cycler-Conditions werden auf die jeweiligen verschiedenen Ansätze abgestimmt.

1. Denaturierung
2. Annealing – Anlagerung der Primer
3. Hybridisierungstemperatur = T<sub>m</sub> (Aufheiz-, Abkühlzeit)
4. Verlängerung der Primer

Im Hinblick auf die Anwendung der Methode mit dem ABI PRISM<sup>™</sup> 7700 Sequence Detector (Perkin Elmer) wird die PCR mit den entsprechenden Reagenzien aus dem Kit für das Gerät durchgeführt. Die Kontrolle der PCR erfolgt im 2%igen Agarosegel.

Im Gegensatz zu anderen DNA-Polymerase ist die hier verwendet Ampli-Taq<sup>®</sup> Gold DNA-Polymerase chemisch so modifiziert, dass sie bei Raumtemperatur inaktiv ist und erst nach Erreichen einer bestimmten Temperatur aktiviert wird.

#### **4.7 Nested-PCR**

Ziel der Nested-PCR oder auch verschachtelten PCR ist die Steigerung der Produktspezifität und die Vermeidung der Amplifizierung unspezifischer Nebenprodukte der ersten PCR.

In einer ersten Runde wird mit externen Primern ein DNA-Molekül amplifiziert, das in einer zweiten PCR den internen Primern als Matrize dient. Durch die Nested-PCR erhöht sich die Empfindlichkeit und Spezifität der DNA-Vervielfältigung erheblich. Unspezifische Produkte der ersten PCR bieten nicht genug

komplementäre Sequenzen für interne Primer und stehen somit in weiteren Runden nicht mehr als Matrize zur Verfügung. Leider steigt mit der hohen Spezifität auch die Anfälligkeit gegenüber Verunreinigungen. Die Thermal Cycler Conditions werden eventuell im zweiten Lauf modifiziert und den verwendeten Primern angepasst.

Testansätze:

2,5 µl 10xPuffer

4,0 µl MgCl<sub>2</sub>

1,0 µl Forward-Primer 200 nM Endkonzentration

1,0 µl Reverse-Primer 200 nM Endkonzentration

2,0 µl dNTP-Mix

0,25 µl UNG-Erase

0,125 µl Polymerase

Aqua dest.

Template

Thermo-Cycler-Conditions: 50°C, 2 min; 94°C, 10 min

95°C, 30 sec; 60°C, 1 min; 74°C, 1 min 35 Zyklen

72°C, 10 min

Perkin Elmer Thermoblock

#### 4.8 Realtime-PCR

Die Realtime-PCR wird mit dem ABI-PRISM™ 7700 Sequenz Detector durchgeführt. Die für die „Goodies“ verwendete Sonde wird 5'-FAM/TAMRA-3' markiert, die für die „Badies“ 5'-VIC/TAMRA-3'. Die Testansätze werden wie folgt pipettiert:

2,5 µl 10xPuffer  
4,0 µl MgCl<sub>2</sub>  
2,5 µl Forward-Primer 10nM  
2,5 µl Reverse-Primer 10nM  
2,5 µl HANDS-Primer 500nM  
2,0 µl dNTP-Mix  
2,5 µl Sonde 200nM FAM-bNOS (Goodies)  
2,5 µl Sonde 200nM VIC-NPY (Badies)  
0,25 µl UNG-Erase  
0,125 µl Polymerase  
Aqua dest.  
Template

Thermo-Cycler-Conditions: 50°C, 2 min; 94°C, 10 min

95°C, 15 sec; 68°C, 2 min 5 Cyclen

95°C, 15 sec; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min 35 Cyclen

#### 4.9 Auswahl von Primersequenzen für die PCR

Die Auswahl geeigneter Primersequenzen ist für die PCR von entscheidender Bedeutung, da die PCR-Primer die spezifische Bindung an die Zielsequenz vermitteln. Idealerweise sollte die Primersequenz im verwendeten Probenmaterial nur ein einziges Mal vorkommen; zumindest aber sollten die beiden die Zielsequenz flankierenden Plusstrang- und Minusstrangprimer nicht in enger Nachbarschaft zueinander außerhalb der Zielsequenz binden können, damit kein unspezifisches PCR-Produkt entstehen kann. Diese Bedingung lässt sich bei

Einsatz chromosomaler DNA oder cDNA in der Regel nicht sicher vorhersagen, sondern nur in Vorversuchen ermitteln. Berechnet werden können jedoch andere wichtige Eigenschaften der Primer, wie die Schmelztemperatur ihrer Bindung an die Zielsequenz und die Neigung zur Ausbildung unerwünschter Sekundärstrukturen (z.B. Haarnadelformation) und Primerdimeren, die dazu führen könnte, dass nur noch ein geringer Teil der eingesetzten Primer für die Produktamplifikation in der PCR zur Verfügung steht, mit der Folge einer geringen Sensitivität. Um hier Vorhersagen treffen zu können, wurden alle verwendeten Primer mit dem Computerprogramm Omiga<sup>®</sup> der Firma Oxford Molecular (seit 2001 zur Gruppe „Accelrys Software“ gehörend) ausgewählt und überprüft.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1 Testung des HANDS-PCR-Prinzips an einem konstitutiv exprimierten Gen („Housekeeping“ Gen)

Zur Etablierung eines PCR-Verfahrens erfolgte zunächst die Testung des HANDS-PCR-Prinzips, an einer konstitutiv exprimierten Gensequenz, einem „Housekeeping“ Gen, hier GAPDH. Die HANDS-PCR („**H**omo-**T**ag-**A**ssisted-**N**on-**D**imer-**S**ystem“) ist ein Verfahren zur Blockierung der Bildung unerwünschter Primer-Dimere, die ansonsten die PCR-Effizienz empfindlich beeinträchtigen könnten (Brownie et al., 1997). Hierbei enthalten alle Primer eine identische, an ihrem 5'-Ende angefügte Nukleotidsequenz, ein sogenanntes „Homo-Tail“. „Housekeeping“-Gene werden weitgehend unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und den Wachstumsbedingungen exprimiert. Deshalb können sie in einer quantitativen PCR-Reaktion als Vergleichswert dienen, der die RNA-Menge und – Qualität der zu untersuchenden Probe widerspiegelt.

#### 5.1.1 Herstellung eines Standards

Die durch reverse Transkription entstandene cDNA wurde als Ausgangsmaterial („Template“) in einer PCR mit spezifischen Primern für die GAPDH-Sequenz eingesetzt. Die spezifischen Primer enthielten an ihrem 5'-Ende die Homo-Tail Sequenz nach dem Prinzip der HANDS-PCR. Die verwendeten Primersequenzen sind im Anschluss aufgelistet:

#### Spezifische GAPDH-Primersequenzen:

Forward Primer mit *Homo-Tail*(HANDS-Primer) und integrierter **Sonden-Sequenz**:

5'- GCG TAC TAG CGT ACC ACG TGT CGA CTG ATC **CTG CTG CGA TGC**  
**AAT GCT TTT** CGC CAT CAA TGA CCC CTT CAT T-3'

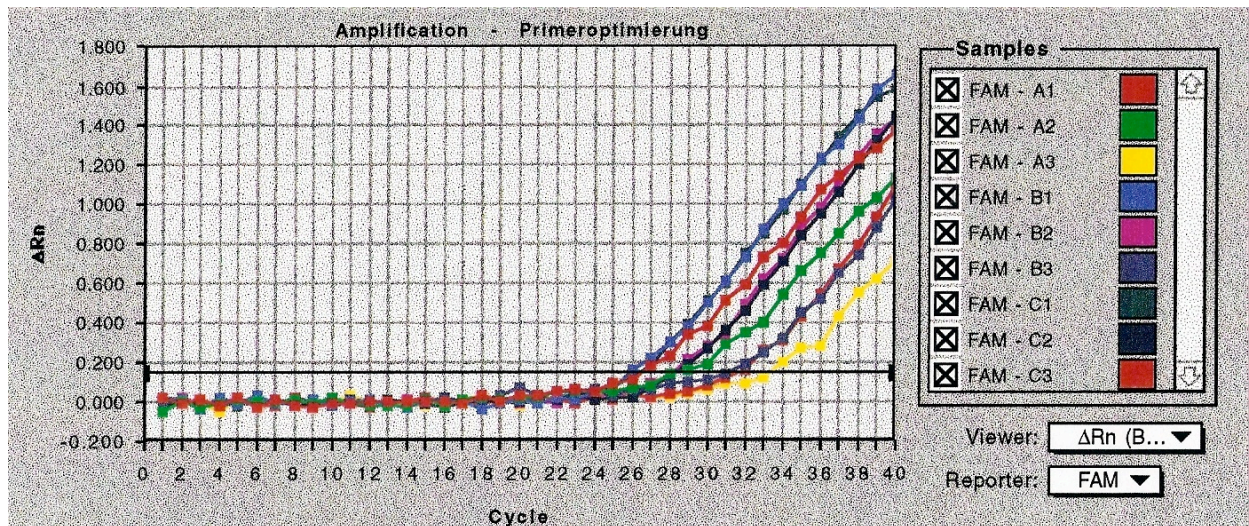
Revers-Primer mit *Homo-Tail* (HANDS-Primer):

5'- GCG TAC TAG CGT ACC ACG TGT CGA CTT GCA AAT GAG CCC CAG  
CCT T-3'

(5'-Homo-Tail kursiv; **Sondenbindungsstelle fett gedruckt**; Spezifische Sequenz unterstrichen)

Um eventuelle durch Kontaminationen verursachte falsch-positive Resultate erkennen zu können wurde als Negativkontrolle eine zusätzliche Probe eingesetzt, die als Template (Ausgangsmaterial) nur Wasser enthält.

Zur Optimierung der Primerkonzentrationen wurde eine Realtime-PCR mit den spezifischen Primern unter Verwendung einer FAM-markierten Sonde durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine Konzentration von 100nM Forward- und 300nM oder 600nM Reverse-Primer bei der niedrigsten Zykluszahl bereits ein positives Signal erbringt und somit die PCR-Amplifikation mit diesen Primerkonzentrationen am effizientesten abläuft. Die Auswertung des Realtime-PCR-Laufes ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abb. 5: Primeroptimierung**

Ergebnis der PCR zur Optimierung der Primerkonzentrationen der spezifischen Primer für das Housekeeping Gen GAPDH.

Dargestellt ist das Ergebnis, wie es vom ABI-PRISM™ Sequence Detector System abgebildet wird. Auf der X-Achse ist die Zahl der abgelaufenen Zyklen abgebildet. Die Y-Achse gibt die in den jeweiligen Zyklen gemessene Fluoreszenzintensität an. Die schwarze Linie parallel zur X-Achse gibt den Grenzwert an, unter dem das Fluoreszenzsignal als negativ zu bezeichnen ist (Threshold). Die Proben sind wie folgt bezeichnet: A1 100nM Forward-Primer + 100nM Reverse-Primer; A2 300nM Forward-Primer + 100nM Reverse-Primer; A3 600nM Forward-Primer + 100nM Reverse-Primer; B1 100nM Forward-Primer + 300nM Reverse-Primer; B2 300nM Forward-Primer + 300nM Reverse-Primer; B3 600nM Forward-Primer + 300nM Reverse-Primer; C1 100nM Forward-Primer + 600nM Reverse-Primer; C2 300nM Forward-Primer + 600nM Reverse-Primer; C3 600nM Forward-Primer + 600nM Reverse-Primer.

Die in dieser PCR entstandene DNA wird im Folgenden als „Standard“ bezeichnet und diente als Template zur Erarbeitung der optimalen PCR-Bedingungen für die endgültige PCR. Die Überprüfung der Homogenität des „Standards“ erfolgte zusätzlich mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Die Isolierung des Standards erfolgte mit dem QIAquick Purification Kit.

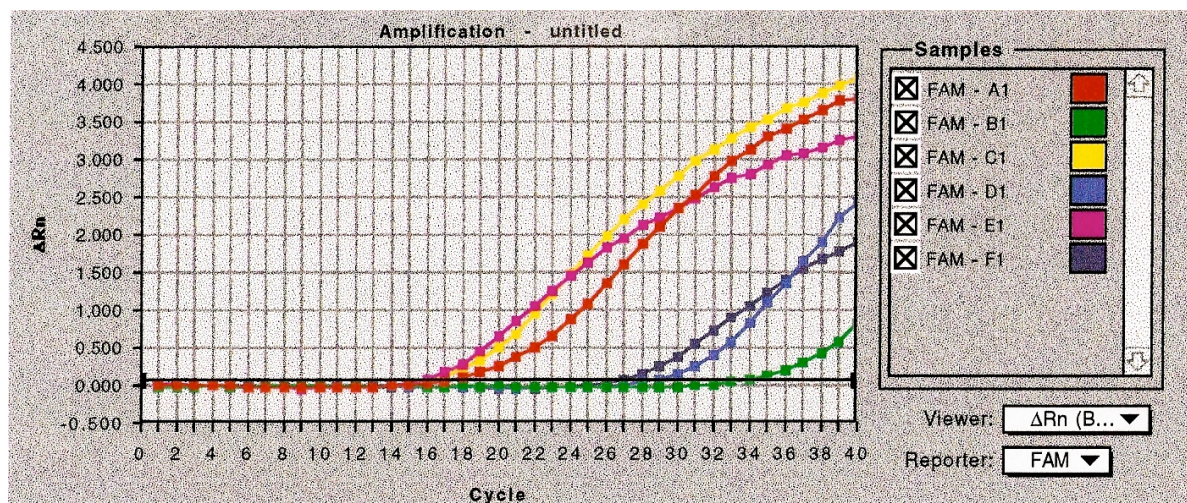


### 5.1.2 Optimierung der PCR-Bedingungen für den Einsatz des „Homotail“- oder „HANDS“-Primers

Als nächster Schritt erfolgte der Einsatz des Homo-Tail-Primers (auch HANDS-Primer genannt). Die Sequenz des Primers lautet: 5'- GCG TAC TAG CGT ACC ACG TGT CGA CT-3'. Im PCR-Testansatz mit dem Homo-Tail-Primer wurde als Template der gewonnene „Standard“ eingesetzt.

Versuchsreihen zur Optimierung der PCR-Bedingungen zeigten, dass eine Annealingtemperatur von 60°C und eine Magnesiumkonzentration von 4 nM die besten Ergebnisse zeigten.

Nun wurden die optimalen Homo-Tail-Primer-Konzentrationen für die Realtime-PCR ermittelt. Es wurden Homo-Tail-Primer-Konzentrationen von 250nM, 500nM und 1000nM und unterschiedliche Konzentrationen des Standards eingesetzt. Abbildung 6 zeigt den Probenansatz mit unterschiedlichen Homo-Tail-Primer-Konzentrationen.



**Abb. 6: Homo-Tail-Primer Optimierung**

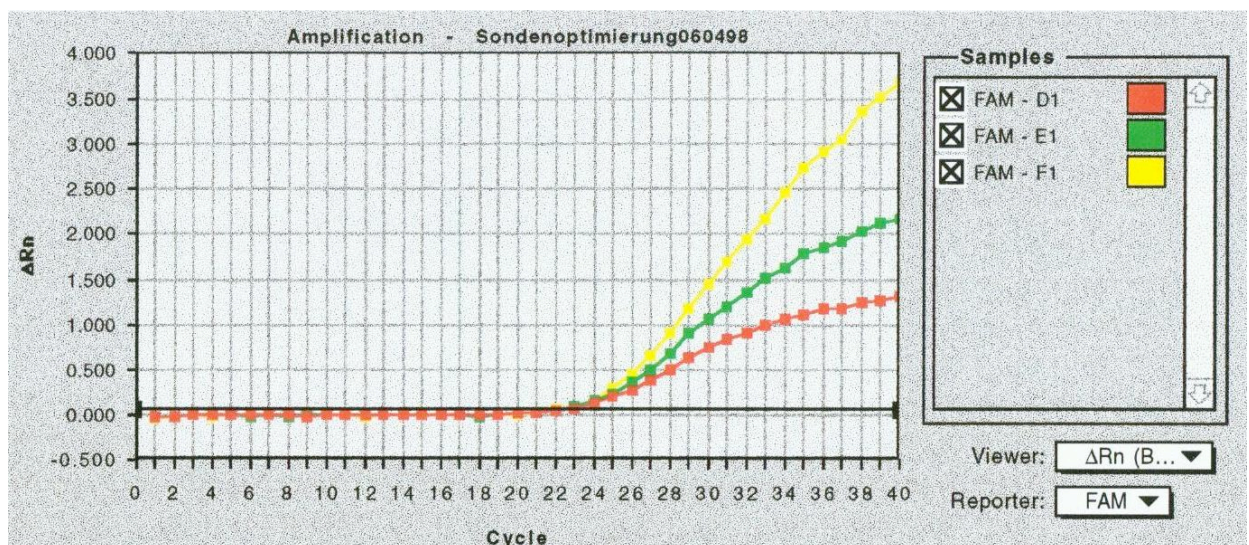
Ergebnis der PCR zur Optimierung der Primerkonzentrationen des Homotail-Primers. Dargestellt ist das Ergebnis, wie es vom ABI-PRISM™ Sequence Detector System abgebildet wird. Auf der X-Achse ist die Zahl der abgelaufenen Zyklen abgebildet. Die Y-Achse gibt die in den jeweiligen Zyklen gemessene Fluoreszenzintensität an. Die schwarze Linie parallel zur X-Achse gibt den Grenzwert an, unter dem das Fluoreszenzsignal als negativ zu bezeichnen ist (Threshold). Die Proben sind wie folgt bezeichnet: A1 Standard-Konzentration  $10^{-2}$  + 250nM Homo-Tail, B1 Standard-Konzentration  $10^{-4}$  + 250nM Homo-Tail, C1 Standard-Konzentration  $10^{-2}$  + 500nM Homo-Tail, D1 Standard-Konzentration  $10^{-4}$  + 500nM Homo-Tail, E1 Standard-Konzentration  $10^{-2}$  + 1000nM Homo-Tail, F1 Standard-Konzentration  $10^{-4}$  + 1000nM Homo-Tail.

Die Konzentrationen von 250 und 500nM zeigten gleich gute Ergebnisse. Im später durchgeführten Multiplex-Ansatz zeigten die 500nM-Ansätze ein etwas

besseres Signal in der Realtime-PCR bei gleich guter Darstellung der Banden im Gel. Bei Anwendung der 1000nM-Konzentration zeigte sich eine klare Bande im Gel bei schlechtem Signal in der Realtime-PCR. Die Homo-Tail-Primer-Konzentration von 500nM zeigte das beste Signal.

### 5.1.3 Optimierung der Sondenkonzentration für die Realtime-PCR

Zur Testung der optimalen Sondenkonzentration wurden folgende Komponenten zusammen pipettiert: Puffer, Magnesiumchlorid, Homo-Tail-Primer, dNTPs, UNG, DNA-Polymerase und als Template der „Standard“. Es wurde eine FAM-markierte Sonde verwendet. Das beste Signal konnte, wie in Abbildung 7 ersichtlich, mit einer Sondenkonzentration von 200nM pro Ansatz erzielt werden.



**Abb. 7: Sondenoptimierung**

Ergebnis der PCR zur Optimierung der Sondenkonzentration. Dargestellt ist das Ergebnis, wie es vom ABI-PRISM™ Sequence Detector System abgebildet wird. Auf der X-Achse ist die Zahl der abgelaufenen Zyklen abgebildet. Die Y-Achse gibt die in den jeweiligen Zyklen gemessene Fluoreszenzintensität an. Die schwarze Linie parallel zur X-Achse gibt den Grenzwert an, unter dem das Fluoreszenzsignal als negativ zu bezeichnen ist (Threshold). Die Proben sind wie folgt bezeichnet: D1 50nM Sondenkonzentration, E1 100nM Sondenkonzentration, F1 200nM Sondenkonzentration

Neben der Optimierung der Sondenkonzentration zeigten Versuchsansätze mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen, dass auch für die Sonden eine Temperatur von 60°C ein gutes Ergebnis zeigt.

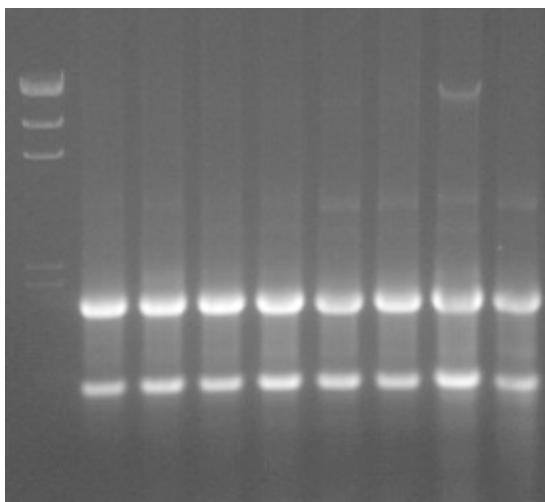
Der nächste Arbeitsschritt beinhaltete die Optimierung der Bedingungen zur Durchführung der Multiplex-PCR. Da in einem Probenansatz verschiedene



Translokationen nachgewiesen werden sollten, mussten die Bedingungen diesbezüglich angepasst werden. Das eingesetzte Template würde später DNA sein. Zu ermitteln war nun die minimal notwendige Primerkonzentration der spezifischen Primer. Da viele verschiedene Primer eingesetzt werden sollten, musste versucht werden, deren Konzentration so niedrig wie möglich zu halten. Auf diesem Wege sollten falsch-positive Ergebnisse oder Primer-Primer-Interaktionen vermieden, Primer gespart und die bestmögliche Ausbeute erreicht werden. Im nächsten Testansatz wurden daher neben dem Homo-Tail-Primer auch die Primerkonzentrationen der Forward- und Revers-Primer variiert. Zusätzlich wurden Negativ-Kontrollen (NTC – no template control = Wasser als Template) mit gemessen. Die Kontrolle der Realtime-PCR Ergebnisse erfolgte nach dem Lauf zusätzlich mittels Agarose-Gelelektrophorese. Primerkonzentrationen von 10-20nM zeigten hier die besten Ergebnisse. Nach Optimierung der PCR-Bedingungen anhand eines Housekeeping Gens erfolgte im Weiteren die Anwendung der hier ermittelten Bedingungen zum Nachweis chromosomaler Translokationen.

## 5.2 Optimierung der PCR-Bedingungen zum Nachweis chromosomaler Translokationen kindlicher Leukämien

Aus den zur Verfügung stehenden Zelllinien wird RNA isoliert. Die Kontrolle erfolgte im Agarosegel, siehe Abbildung 8.



**Abb. 8: Kontrolle der aus Zelllinien von Leukämiezellen isolierten RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese.**

Abgebildet ist der Längenstandard BioLadder Standard IV von AGS (links im Bild) und die aus den verschiedenen Zellreihen isolierte RNA.

Die RNA wurde mittels RT-PCR in cDNA umgewandelt. Nach Isolierung der DNA wurden die mit dem Housekeeping Gen erarbeiteten PCR-Bedingungen verwendet, um geeignete Primer zur Detektion prognostisch relevanter chromosomaler Translokationen auszuwählen.

Im Folgenden werden die genetischen Marker von Leukämien mit schlechter Prognose als „Badies“, die mit guter Prognose als „Goodies“ bezeichnet.

### **5.2.1 Auswahl der geeigneten Primer zur Detektion prognostisch relevanter chromosomaler Translokationen**

Die ersten PCR-Ansätze erfolgten zur Testung der spezifischen Primer. Es wurde die nach RNA-Isolation und RT-PCR gewonnene DNA mittel QIAquick Purification Kit isoliert und als Template in einen Ansatz mit spezifischen Primern mit der integrierten Homo-Tail- und Sondensequenz pipettiert. Wie schon zu Beginn der Vorversuche erfolgten zunächst Reaktionsansätze im Perkin Elmer Thermoblock ohne TaqMan<sup>TM</sup>-Sonde bevor die Durchführung der Realtime-PCR folgte. Hier zeigte sich zunächst, dass mit den verwendeten Primern keine sauberen Banden zu erzielen waren. Auch die Modifikation der Testansätze, die Variation der Primerkonzentrationen, die Veränderung der Annealingtemperaturen und der Versuch unterschiedlicher Magnesiumkonzentrationen führte bei guter Ausbeute der RNA-Isolation nicht zum gewünschten Ziel.

Da mit Hilfe der spezifischen Primer zur Amplifizierung der Translokationen keine spezifischen Banden nachzuweisen waren, erfolgte zunächst die Überprüfung des Ausgangsmaterials, der aus den Zelllinien gewonnen RNA und des Folgeprodukts nach reverser Transkription, der cDNA. Hierzu wurden die im Kapitel 5.1.1 beschriebenen Primer zum Nachweis des Housekeeping Gens verwendet. Es zeigte sich, dass die RNA von ausreichender Qualität war, da mit diesen Primern ein spezifisches PCR-Produkt erhalten wurde. Mit den spezifischen Primern zum Nachweis der Translokationen kindlichen Leukämien, waren jedoch keine Amplifikationsprodukte zu erzielen, die in der Agarose-Gelelektrophorese anhand spezifischer Banden nachgewiesen werden konnten.

Zur Erhöhung der PCR-Sensitivität und -Spezifität wurde daher die entscheidende PCR-Reaktion im TaqMan<sup>TM</sup> als zweiter Lauf einer Nested-PCR durchgeführt. Die im ersten Schritt der Nested-PCR eingesetzten externen Primer enthielten keine

Homo-Tail-Sequenz und auch kein integrierte Sondensequenz. Auch hier wurden Optimierungsversuche bezüglich der richtigen Konzentrationen und Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten externen Primer lauten:

### **Externe Primer für vor geschalteten Lauf einer Nested-PCR:**

#### **„Badies“:**

Bady 1 und 2 t(9;22) (mBCR Positivzelllinie: SD1; MBCR Positivzelllinie: K562)

→m-BCRupmRNA

5'-CAGCTCCAATGAGAACCTCACCTCCAGCG

→M-BCRupmRNA

5'-AGAGAAGAGGGCGAACAAGGGCAGCAAGG

→ABLdomRNA

5'-CTCAGCGGATACTCAGCGGCATTGCGG

#### **„Goodies“:**

Goody 1 t(12;21) (verwendete Positivzelllinie: REH)

→TELupmRNA

5'-GGCACTCCGTGGATTTCAAACAG

→AMLdomRNA

5'-AACGCCTCGCTCATCTTGCCTGG

Goody 2 t(8;21) (verwendete Positivzelllinie: Kasumi)

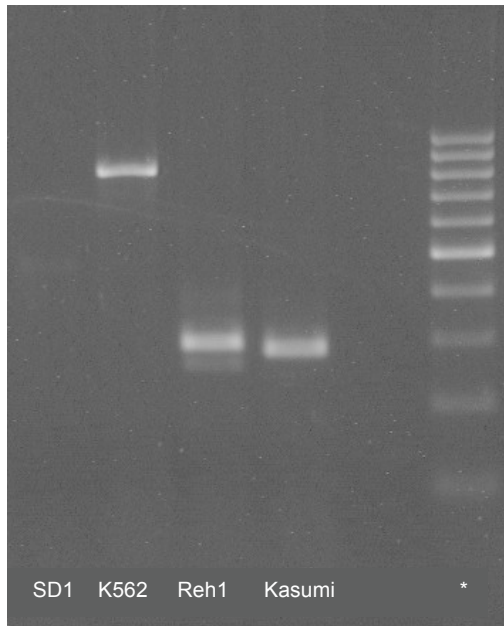
→AML1upmRNA

5'-TTCACAAACCCACCGCAAGTCG

→ETOdomRNA

5'-TGAAGTGGTTCTTGGAGCTCCTTG

Eine Konzentration von 2µM spezifischer Primer im ersten Lauf der Nested-PCR erwies sich in mehreren Versuchen als die optimale Konzentration. Zur Kontrolle der Zelllinien wurde zusätzlich zu dem Lauf mit den spezifischen externen Primern ein paralleler Lauf mit GAPDH-Primern durchgeführt. Das Ergebnis des ersten Laufes der Nested-PCR wurde im Agarosegel (Abbildung 9) überprüft.



**Abb. 9: Agarose-Gelelektrophorese des ersten Laufs der Nested-PCR mit den spezifischen Primern**

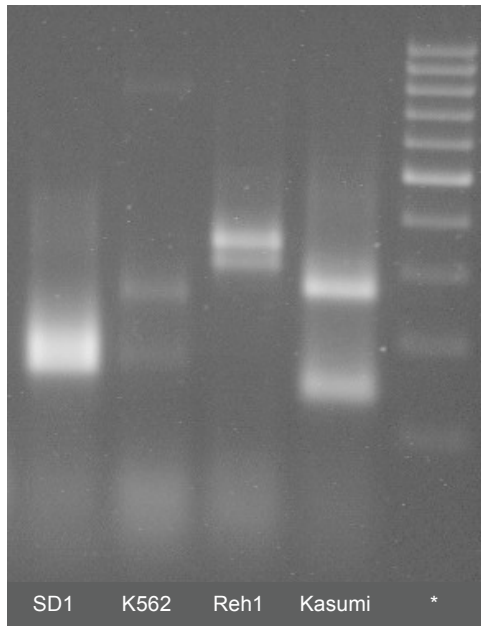
Abgebildet ist das Ergebnis der Gelelektrophorese. Rechts der Größenstandard BioLadder 100 der Firma AGS (\*), die dicke Bande liegt bei 500 bp, der Abstand von Bande zu Bande beträgt jeweils 100 bp. Es finden sich eine sehr schwache Bande für SD 1 und deutliche Banden für K562, Reh1 und Kasumi.

Das aus diesem PCR-Schritt gewonnene Produkt wurde als Template im nächsten Schritt der PCR eingesetzt.

### 5.2.2 Optimierung der PCR-Bedingungen für die Realtime-PCR

Die Optimierung der eingesetzten internen Primer, die in der endgültigen Realtime-PCR eingesetzt wurden, erfolgte im Anschluss. Zur Optimierung wurden Einzelansätze ohne TaqMan<sup>TM</sup>-Sonde durchgeführt. Dies bedeutet, in die Reaktionsansätze wurden lediglich die zur Zelllinie passenden internen Primer pipettiert. Da im endgültigen Ansatz viele verschiedene Primer in einen Ansatz pipettiert wurden, mussten die Konzentrationen der spezifischen internen Primer möglichst gering gehalten werden.

Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen und Verdünnungsreihen zeigten die besten Ergebnisse bei Konzentrationen der Primer von 10nM. Die Variation der Magnesiumkonzentrationen zeigte, ebenso wie die Variationen der Annealingtemperaturen keine deutliche Verbesserung der Ergebnisse. Um sicher zu gehen, dass die richtigen Sequenzen amplifiziert wurden, wurde vor Durchführung der Multiplex-PCR eine Versuchsreihe mit Einzelansätzen durchgeführt. D.h. je Ansatz wurde nur das zur Zelllinie passende Primerpaar pipettiert. Die Überprüfung erfolgte erneut im Agarosegel (Abbildung 10).



**Abb. 10: Agarose-Gelelektrophorese des zweiten Laufes der Nested-PCR mit den spezifischen Primern nicht als Multiplex-PCR**

Abgebildet ist das Ergebnis der Gelelektrophorese. Rechts der Größenstandard BioLadder 100 der Firma AGS (\*), die dicke Bande liegt bei 500 bp, der Abstand von Bande zu Bande beträgt jeweils 100 bp. Es finden sich eine sehr schwache Bande für K562 und deutliche Banden für SD1, Reh1 und Kasumi.

Erst nach Optimierung dieser PCR-Bedingungen erfolgte im zweiten Schritt die Testung der Realtime-PCR. Als Negativkontrolle dienten Wasser und DNA aus Zelllinien ohne genetische Marker von Leukämien (HL60).

Die hier verwendeten Primer- und Sondensequenzen, die auch im entscheidenden Realtime-PCR-Ansatz verwendet wurden, sind im Folgenden aufgelistet:

**Primersequenzen, die im entscheidenden PCR-Lauf nach dem TaqMan™-Verfahren unter Einsatz von „PIRS“ verwendet werden:**

**„Badies“:**

m-BCR intern Hands sense:

5'-gCgTACTAgCgTACCACgTgTCgACT-CCAATgAgAACCTCACCTCCAgCg

M-BCR intern Hands sense:

5'-gCgTACTAgCgTACCACgTgTCgACT-AgAgggCgAACAAgggCAgCAAgg

ABL intern Hands NPY antisense

(Gegenprimer für beide o.g. Primer, sowohl für M-BCR als auch für mBCR):

5'-gCgTACTAgCgTACCACgTgTCgACT-gA-

**TgTggTAgCATTTgCAgTCTgCTggC-gCggATACTCAgCggCATTgCgg**

(5'-Homo-Tail kursiv; Sondenbindungsstelle fett gedruckt; Spezifische Sequenz unterstrichen)

**„Goodies“:**

TEL intern Hands HNNO sense:

5'-gCgTACTAgCgTACCACgTgTCgACT-gA-**TCCTgCTgCgATgCAATgCTTTTC-**  
CggCACTCCgTggATTTCAAACAg

AML1 intern Hands antisense

5'-gCgTACTAgCgTACCACgTgTCgACT-AACgCCTCgCTCATCTTgCCTgg

AML1 intern Hands sense

5'-gCgTACTAgCgTACCACgTgTCgACT-CTTCACAAACCCACCGCAAgTCg

ETO intern Hands HNNO antisense

5'-gCgTACTAgCgTACCACgTgTCgACT-gA-**TCCTgCTgCgATgCAATgCTTTTC-**  
TgAACTggTTCTTggAgCTCCTTg

(5'-Homo-Tail kursiv; **Sondenbindungsstelle fett gedruckt**; Spezifische Sequenz unterstrichen)

Im Anschluss erfolgte die Durchführung der Multiplex-PCR mit Primern mit primerintegrierten Reportersequenzen als Realtime-PCR.

### **5.3 Automatisierter Nachweis chromosomaler Translokationen kindlicher Leukämien mit Hilfe der Multiplex-Realtime-PCR mit primerintegrierten Reportersequenzen**

Neben dem Homo-Tail-Primer wurden bei der Realtime-PCR eine FAM-markierte Sonde zum Nachweis der Gensequenzen mit guter Prognose und um eine VIC-markierte Sonde zum Nachweis der Gensequenzen mit schlechter Prognose verwendet. Die Sequenz des Homo-Tail-Primer und die Sondensequenzen lauten wie folgt:

5'-Homo-Tail =

5'-gCgTACTAgCgTACCACgTgTCgACT

zwischen Homo-Tail (HANDS-Tag) und Sondenbindungsstelle 2 Basen zusätzlich:  
 gA

FAM-Sonde (für Goodies):

**5'-(FAM)-TCCTgCTgCgATgCAATgCTTTTC-(TAMRA)**

VIC-Sonde (für Badies):

**5'-(VIC)-TgTggTAgCATTgCAgTCTgCTggC-(TAMRA)**

Nach Testung der spezifischen externen und internen Primer im Einzelansatz, wie oben beschrieben, erfolgte im weiteren Verlauf der Versuche die Durchführung einer einfachen Realtime-PCR. Unter Kenntnis des Templates wurden die spezifischen Primer für die vorliegende Translokation pipettiert, die Sonden zugegeben und ein entsprechendes Signal erzielt. Als nächstes wurde versucht, eine Multiplex-PCR zu etablieren. Erneut wurden optimale Bedingungen in unterschiedlichen Testansätzen erprobt. Mit folgendem Testansatz gelang die Durchführung der geplanten, als Ziel dieser Arbeit avisierten Multiplex-PCR.

Ein 50µl Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

5µl 10x PCR-Puffer

4µl 25nM MgCl<sub>2</sub>

2µl dNTP-Mix (ATP, CTP, GTP und TTP)

5µl „Homo-Tail“-Primer (500 nM Endkonzentration)

5µl FAM-Sonde (200 nM Endkonzentration)

5µl VIC-Sonde (200 nM Endkonzentration)

0,25 µl UNG (Substanz zur Elimination von Kontaminationen)

0,125 µl AmpliTaq® Gold Polymerase

0,5µl von jedem spezifischen Primer (PIRS-modifizierte Primer und jeweilige Gegenprimer, 10nM Endkonzentration)

2µl der zu untersuchenden Probe

steriles Aqua bidest. ad 50 µl



Die PCR-Cycler Bedingungen sind folgende:

50°C - 2 min (Kontaminationsinaktivierung durch UNG)

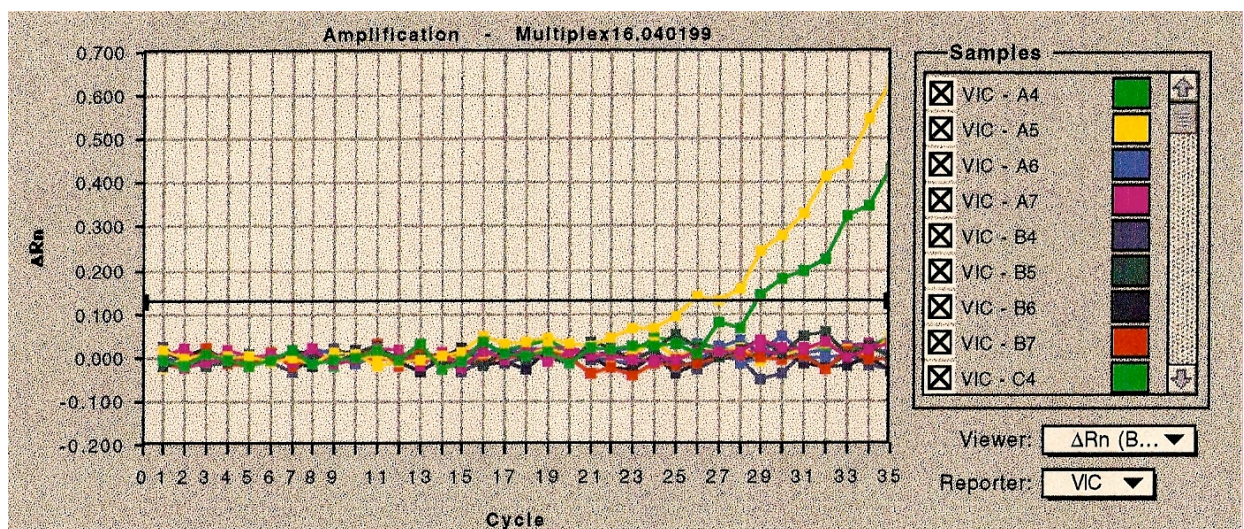
95°C - 10 min (Denaturierung und Aktivierung der AmpliTaq® Gold

Polymerase = Hot Start)

danach 5 Zyklen zu 95°C - 15 s → 60°C - 1 min → 72°C 1 min

danach 35 Zyklen zu 95°C 15 s → 68°C - 1 min → 72°C 1 min

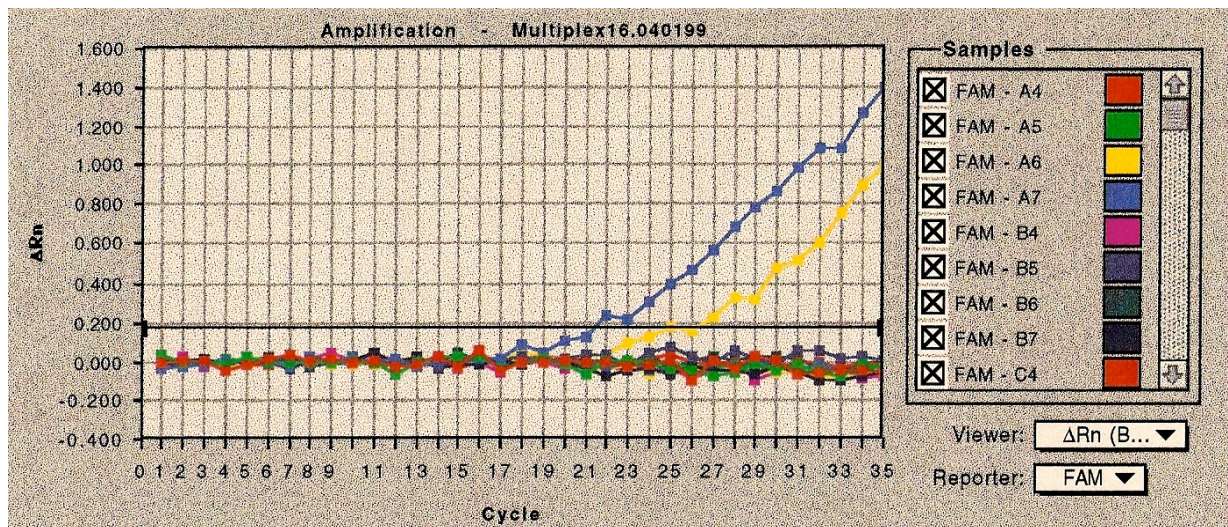
Die Ergebnisse der Multiplex-PCR unter Einsatz von PIRS mit TaqMan™ Verfahren sind in Abbildung 11 und 12 mit unterschiedlichen Farbfiltern abgebildet.



**Abb. 9: Multiplex-PCR zu Differenzierung von Leukämien unterschiedlicher Prognose mittels eines Testabsatzes – Badies:**

Ergebnis der VIC-Signale der Multiplex-PCR mit PIRS. Dargestellt ist das Ergebnis, wie es vom ABI-PRISM™ Sequence Detector System abgebildet wird. Auf der X-Achse ist die Zahl der abgelaufenen Zyklen abgebildet. Die Y-Achse gibt die in den jeweiligen Zyklen gemessene Fluoreszenzintensität an. Die schwarze Linie parallel zur X-Achse gibt den Grenzwert an, unter dem das Fluoreszenzsignal als negativ zu bezeichnen ist (Threshold). Die Proben sind wie folgt bezeichnet: A4 = m-BCR (Bady), A5 = M-BCR (Bady), A6 = TEL/AML (Goody), A7 = AML/ETO (Goody), B4 - B7 = vier gleiche Negativkontrollen (mRNA der Zelllinie HL60 ohne Translokation; C4 = Wasserkontrolle der PCR (ohne Template).



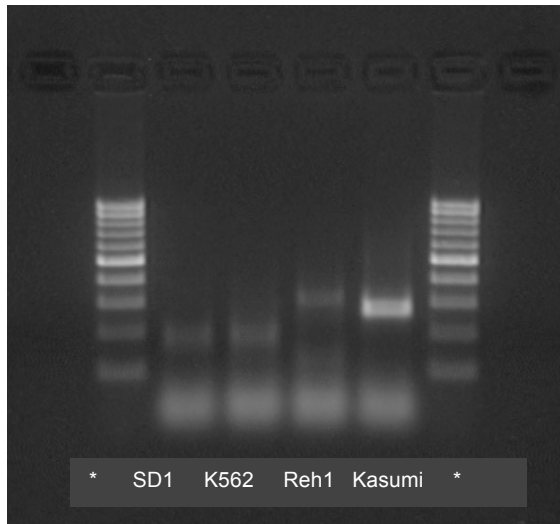


**Abb.10: Multiplex-PCR zu Differenzierung von Leukämien unterschiedlicher Prognose mittels eines Testabsatzes – Goodies:**

Ergebnis der FAM-Signale der Multiplex-PCR mit PIRS. Dargestellt ist das Ergebnis, wie es vom ABI-PRISM™ Sequence Detector System abgebildet wird. Auf der X-Achse ist die Zahl der abgelaufenen Zyklen abgebildet. Die Y-Achse gibt die in den jeweiligen Zyklen gemessene Fluoreszenzintensität an. Die schwarze Linie parallel zur X-Achse gibt den Grenzwert an, unter dem das Fluoreszenzsignal als negativ zu bezeichnen ist (Threshold). Die Proben sind wie folgt bezeichnet: A4 = m-BCR (Bady), A5 = M-BCR (Bady), A6 = TEL/AML (Goody), A7 = AML/ETO (Goody), B4 - B7 = vier gleiche Negativkontrollen (mRNA der Zelllinie HL60 ohne Translokation; C4 = Wasserkontrolle der PCR (ohne Template).

Man sieht, dass nur die "Badies" ein positives VIC-Signal aufweisen, während nur die "Goodies" ein positives FAM-Signal zeigen. Alle anderen Proben sind negativ. Es liegen somit keine falsch-positiven Resultate vor. Als Negativkontrollen dienten eine Wasserkontrolle und DNA, gewonnen aus der Zelllinie HL60.

Zur Überprüfung des Online-PCR Ergebnisses wurde im Anschluss der Messung im TaqMan™ eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt um das Ergebnis zu sichern. Das Ergebnis der Gelelektrophorese ist in Abbildung 12 dargestellt.



**Abb. 11: Agarose-Gelelektrophorese der Multiplex-PCR mit PIRS**

Abgebildet ist das Ergebnis der Gelelektrophorese. Links und Rechts der Größenstandard BioLadder 100 der Firma AGS (\*), die dicke Bande liegt bei 500 bp, der Abstand von Bande zu Bande beträgt jeweils 100 bp. Es finden sich schwache Banden für SD1, K562 und Reh1 sowie eine stärkere Bande für Kasumi.

Anhand der durchgeführten Versuche konnte gezeigt werden, dass mittels Multiplex-Realtime-PCR unter der Verwendung primerintegrierter Reportersequenzen und der Verwendung der HANDS-PCR der Nachweis verschiedener Translokationen kindlicher Leukämien in einem Testansatz möglich ist. Hier erfolgte die Verwendung zweier verschiedener Sonden, womit eine Differenzierung leukämiespezifischer Veränderungen mit guter und schlechter Prognose möglich war (Abb. 11 und 12).

## 6. DISKUSSION

### 6.1 Entwicklung einer Multiplex- Realtime-PCR mit fluoreszenzoptischer Produktdetektion über primerintegrierte Reportersequenzen (PIRS)

Die sogenannte „Realtime“-PCR erlaubt eine direkte Produktdetektion während der PCR-Reaktion. Hierbei werden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide (Sonden) verwendet, die dem PCR-Ansatz zugesetzt werden. Diese Sonden binden üblicherweise innerhalb der zu amplifizierenden Zielsequenz und generieren ein direkt messbares Fluoreszenzsignal während der PCR-Amplifikation. Da die Intensität des Fluoreszenzsignals direkt proportional zur Menge des PCR-Produkts ist, sind quantitative Aussagen über die Menge der ursprünglich im PCR-Ansatz vorhandene Anzahl der Kopien der nachzuweisenden Zielsequenz möglich, solange sich die PCR-Reaktion in der Phase der exponentiellen Produktvermehrung befindet. In dieser Form hat die Realtime-PCR als quantitative PCR eine sehr weite Verbreitung gefunden.

Das Verfahren der Realtime-PCR ist prinzipiell „multiplex-fähig“, d.h. es können in einer einzigen PCR-Reaktion mehrere Zielsequenzen gleichzeitig detektiert werden. Hierbei muss für jede zu erfassende Zielsequenz eine eigene Sonde (TaqMan<sup>TM</sup>), bzw. ein Sondenpaar (Light-Cycler) mit einer spezifischen Fluoreszenzmarkierung zugesetzt werden. Neben dem Aufwand der Sondengenerierung bleibt eine wesentliche Einschränkung hinsichtlich der Zahl gleichzeitig erfassbarer Zielsequenzen: Die Zahl der Sondenfarbstoffe ist begrenzt und somit können nicht mehr als 3 – 5 Zielsequenzen gleichzeitig in einer Multiplex-PCR nachgewiesen werden.

Das Ziel dieser Arbeit lag darin zu prüfen, ob die Sondenbindungsstelle in die PCR-Primer gelegt werden kann, wodurch eine einzige Sonde dem Nachweis mehrerer Zielsequenzen dienen kann. Die Sondenbindungsstelle wird in der Arbeit auch als „primerintegrierte Reportersequenz (PIRS)“ bezeichnet. Zur Umsetzung wurde das TaqMan<sup>TM</sup>-PCR System gewählt, da hier nur jeweils eine Sonde benötigt wird. Im Light-Cycler wird für jede Zielsequenz ein Sondenpaar benötigt, wodurch sich die Länge der für eine Sondenbindung erforderlichen Anschnitte in PCR-Primern gegenüber dem TaqMan<sup>TM</sup>-PCR System verdoppelt. Hierdurch steigen die Kosten der Primersynthese und die Gefahr unspezifischer

Primerbindung mit den möglichen Folgen falsch-positiver Resultate und geringerer Sensitivität.

Der Nachweis von PCR-Produkten über primerintegrierte Reportersequenzen (PIRS) kann natürlich nur funktionieren, wenn ein spezifisches Fluoreszenzsignal erst dann generiert wird, wenn die Primer in ein PCR-Produkt eingebaut worden sind und keinesfalls schon die in allen Primern von Anfang an vorhandenen Sondenbindungsstellen dieses Signal hervorrufen können.

Dieses Problem lies sich unter Nutzung des spezifischen Reaktionsablaufs, der für die Entstehung des Fluoreszenzsignals bei der TaqMan™-PCR erforderlich ist, lösen. So entsteht das sondenspezifische Fluoreszenzsignal in der TaqMan™-PCR erst dann, wenn die Sonde während der PCR durch die Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten wird. Dies kann jedoch nur gelingen, wenn die DNA-Synthese der Taq-Polymerase auch über die Sondenbindungsstelle der Primer läuft und zwar, wie oben erwähnt, ausschließlich bei den Primern, die bereits in ein Amplifikationsprodukt eingebaut worden sind. Damit eine DNA-Synthese über die Sondenbindungsstelle dieser produktgebundenen Primer laufen kann, muss den Primern 5'-wärts vor der Sondenbindungsstelle eine weitere Sequenz angefügt werden, die in dieser Arbeit als „Homo-Tail“ bezeichnet wird. Abbildung 12 zeigt eine schematische Darstellung eines solchen Primers mit integrierter Sondenbindungsstelle. Der in der PCR zu verwendende zweite Primer mit entgegen gesetzter Polarität braucht keine Sondenbindungsstelle zu enthalten.



**Abb. 12: Strukturdarstellung eines PCR-Primers mit integrierter Sondenbindungsstelle (PIRS) für das TaqMan™ System**

An dieser zusätzlichen, grundsätzlich frei wählbaren „Homo-Tail“-Sequenz können komplementäre Oligonukleotide (weitere Primer) binden, die dann eine DNA-Synthese über die Sondenbindungsstelle der produktgebundenen spezifischen Primer initiieren, mit der Folge, dass die an die Sondenbindungsstellen angelagerten fluoreszenzmarkierten Sonden durch die Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten werden und das spezifische Fluoreszenzsignal detektiert werden kann.

Grundsätzlich können die Amplifikation der Zielsequenz mit den die Sondenbindungsstellen tragenden spezifischen Primern und die Generierung des Fluoreszenzsignals mit zusätzlichen „Homo-Tail“-Primern in einem Reaktionsansatz ablaufen, entsprechend der HANDS-PCR (Brownie et al, 1997). Dies hat jedoch in der praktischen Umsetzung nicht funktioniert. Wahrscheinlich führt die aufgrund der beiden zusätzlich angefügten Primerdomänen (Sondenbindungsstelle und „Homo-Tail“) große Länge der Primer leicht zu Primerdimeren und linearem unspezifischem Einbau der Primer auch außerhalb der Zielsequenz. Das HANDS-PCR-Prinzip, das eigentlich die Bildung von Primerdimeren sehr effizient reduzieren kann, scheint aufgrund der relativ geringen Längendifferenz zwischen den zur spezifischen Produktamplifikation eingesetzten Primern und dem durch die Amplifikationsreaktion entstehenden PCR-Produkt nicht effizient zu funktionieren.

Aus diesem Grund wurden die Amplifikation eines spezifischen PCR-Produkts mit den die Sondenbindungsstellen und das „Homo-Tail“ tragenden Primern und die anschließende Generierung des Fluoreszenzsignals mit „Homo-Tail-Primern“ in zwei PCR-Läufen getrennt durchgeführt, im Sinne einer nested-PCR. Auf diese Weise konnte mit dem beschriebenen Anwendungsbeispiel, dem Nachweis verschiedener prognostisch relevanter chromosomaler Translokationen, wie sie bei Leukämieerkrankungen im Kindesalter auftreten, der Nachweis der Funktionsfähigkeit des Verfahrens erbracht werden.

## **6.2 Einsatz primerintegrierter Reportersequenzen (PIRS) zum Nachweis prognostisch relevanter chromosomaler Translokationen in Leukämiezellen**

Wie oben erwähnt, bieten PCR-Techniken, die ein durch die PCR-Amplifikation generiertes Fluoreszenzsignal während des Reaktionsablaufs „on-line“ erfassen, bereits die Möglichkeit, mehrere Zielsequenzen in einem Reaktionsansatz gleichzeitig zu detektieren, d.h. sie sind prinzipiell „multiplex-fähig“. Liegt die für die Generierung des Fluoreszenzsignals erforderliche Sondenbindungsstelle innerhalb der Zielsequenzen, so wird für jede Zielsequenz eine gesonderte Fluoreszenzfarbe benötigt, was die Zahl der in einer Reaktion gleichzeitig erfassbaren Zielsequenzen auf eine Zahl deutlich unter 10 beschränkt.

Die in dieser Arbeit beschriebene Nutzung primerintegrierter Reportersequenzen (PIRS), bei der die Sondenbindungsstellen in die spezifischen PCR-Primer integriert wird, kann die Zahl gleichzeitig erfassbarer Zielsequenzen deutlich erhöhen. Hierbei bleibt zwar die Beschränkung durch die Zahl der zur Verfügung stehenden Fluoreszenzfarben erhalten, jede Fluoreszenzfarbe kann jedoch zur Detektion einer größeren Zahl von Zielsequenzen genutzt werden. Dabei bleibt zu beachten, dass die einzelnen Zielsequenzen, die über die gleiche Fluoreszenzfarbe detektiert werden, nicht voneinander unterschieden werden können. Somit können zwar Gruppen von Zielsequenzen voneinander unterschieden werden, wenn ihnen jeweils eine Fluoreszenzfarbe zugewiesen wird, innerhalb der Gruppen sind jedoch keine weiteren Diskriminierungen möglich. Die Zusammenfassung verschiedener Zielsequenzen zu einer Gruppe gleicher Fluoreszenzfarbe kann beispielsweise sinnvoll sein, wenn alle Zielsequenzen einer solchen Gruppe die gleichen diagnostischen oder therapeutischen Konsequenzen zur Folge haben.

Ein solches Beispiel ist die in dieser Arbeit unter Verwendung primerintegrierter Reportersequenzen (PIRS) entwickelte Multiplex-Realtime-PCR zur Differenzierung chromosomaler Translokationen kindlicher Leukämien mittels des Sequence Detectors ABI PRISM<sup>TM</sup> 7700. Hierbei wurde zwischen zwei Gruppen von Zielsequenzen unterschieden, eine mit chromosomalen Translokationen, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind und eine zweite Gruppe, deren Translokationen als prognostisch günstige Marker gelten. Da die chromosomalen Translokationen in der entsprechenden mRNA nachgewiesen werden sollten, auf DNA-Ebene wären die zu erfassenden DNA-Abschnitte aufgrund mit zu erfassender Intronabschnitte sehr viel größer gewesen, musste die zelluläre DNA zuerst in komplementäre DNA (cDNA) revers transkribiert werden, um in der PCR als Ausgangsmaterial dienen zu können.

Nach Optimierung der PCR-Bedingungen ließen sich in cDNA aus Leukämiezellen der Zelllinien SD1 und K562 als Marker für kindliche Leukämien mit schlechter Prognose und aus cDNA der Zelllinien Reh1 und Kasumi als Marker für kindliche Leukämien mit guter Prognose die entsprechenden Translokationen nachweisen. Somit konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der primerintegrierten Reportersequenzen (PIRS) und der Anwendung des HANDS-Verfahrens eine

Differenzierung verschiedener Marker kindlicher Leukämien in einem Multiplex-Realtime-PCR-Ansatz möglich ist.

### **6.3 Weitere Anwendungsmöglichkeiten primerintegrierter Reportersequenzen (PIRS)**

Neben der Differenzierung von Translokationen bei Leukämien sind viele weitere Anwendungsgebiete des in dieser Arbeit beschriebenen PCR-Verfahrens denkbar. So zum Beispiel eine Differenzierung zwischen viralen und bakteriellen Erregern im Liquor cerebrospinalis. Hierbei würde es für eine schnelle Therapieentscheidung ausreichen, zu wissen welche Gruppe von Erregern vorliegt um entweder eine Breitspektrum-Antibiotikabehandlung oder eine antivirale Therapie so schnell wie möglich einleiten zu können, bzw. nicht beide Behandlungsstrategien parallel anwenden zu müssen. Eine weitere denkbare Anwendungsmöglichkeit wäre die qualitative und quantitative Differenzierung zwischen einer  $T_{H1}$ - und einer  $T_{H2}$ -Zytokinantwort bei immunologischen Prozessen.

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass bereits das im obigen Kapitel diskutierte PCR-System zur Diskriminierung von nur vier Zielsequenzen, zwei Translokationen mit guter und zwei mit schlechter Prognose bei Leukämien des Kindesalters, einen hohen Etablierungs- und Optimierungsaufwand erforderte. Wir gingen deshalb davon aus, dass ein PIRS-PCR-System mit einer größeren Zahl von Zielsequenzen und entsprechend mehr Primern einen noch höheren Aufwand erfordern würde. Dies wäre nur sinnvoll, wenn das zu entwickelnde PCR-System breite Anwendung und Akzeptanz fände.

Daneben zeigte sich im Rahmen der Recherchen des Deutschen Patentamts, wo das PIRS-PCR-Verfahren zum Patent angemeldet worden war, dass die Firma Astra-Zeneca ein ähnliches Verfahren angemeldet hatte. Diese Information stand uns erst nach Abschluss der dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche zur Verfügung, da sich die Anmeldung der Firma Astra-Zeneca zuvor noch in der nach Anmeldung bis zu einem Jahr dauernden Phase befand, in der keine Veröffentlichung erfolgen muss. Nach unserer Einschätzung rechneten wir jedoch damit, dass zumindest die universellen Punkte unserer Patentanmeldung („claims“) rechtlich strittig werden könnten.

Ein weiterer Punkt, der eine Weiterentwicklung der PCR mit primerintegrierten Reportersequenzen als nicht sinnvoll erscheinen liest, war die rasante Entwicklung der DNA-Chip-Technologie, die in der Zahl gleichzeitig zu erfassender genetischer Veränderungen, bzw. genetischer Informationen unserem PIRS-PCR-Verfahren weit überlegen sein wurde (Ferrari et al., 2003). Bei der DNA-Chip-Technologie werden auf Trägern fixierte DNA-Abschnitte, sogenannte Zielgene, mit isolierter RNA, bzw. cDNA, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist, hybridisiert. Anhand der Stärke des Fluoreszenzsignals erhält man beispielsweise Informationen über aktive Gene und deren Expression. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich tausende von Genen parallel zu analysieren (Holzmann, 2006). Der einzige Vorteil der PIRS-PCR gegenüber DNA-Chips ist ihre höhere Empfindlichkeit. Dieser Vorteil ist jedoch bei den allermeisten Fragestellungen nicht wesentlich.

Somit wurde die Weiterentwicklung der PCR mit primerintegrierten Reportersequenzen (PIRS) nach Ende dieser Arbeit von uns aus den folgenden drei Gründen eingestellt: Dem unerwartet hohen Etablierungsaufwand für spezifische Anwendungen, zu erwartender strittiger Punkte bei dem Erhalt eines umfassenden Patentschutzes und der Überlegenheit der sich entwickelnden DNA-Chip-Technologie hinsichtlich der Zahl in einem Reaktionsansatz gleichzeitig erfassbarer Zielsequenzen.



## 7. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, mit Hilfe von Primern mit integrierten Reportersequenzen (PIRS) Gruppen unterschiedlicher Zielsequenzen in einem Realtime-PCR-Ansatz zu differenzieren. In einer Multiplex-Realtime-PCR wird dieses Verfahren angewandt, um bei Leukämien des Kindesalters jeweils zwei chromosomale Translokationen mit guter und zwei chromosomalen Translokationen mit schlechter Prognose in einem einzigen Reaktionsansatz direkt während der laufenden PCR zu detektieren. Zur Durchführung der Realtime-PCR wird der ABI-PRISM™ 7700 Sequence Detector der Firma Applied Biosystems verwendet.

## 8. SUMMARY

Based on Realtime-PCR with the ABI-PRISM™ 7700 Sequence Detector a new technique was developed in order to increase the number of target sequences which can be detected in a single PCR. Different to the usual Taq-Man™-Realtime-PCR the target sites for fluorescent probes were not located within the target sequences itself but integrated into the PCR-Primers, designated as "primer-integrated-reporter-sequences (PIRS)". By using this technique it was possible to detect four different chromosomal translocations frequently found in childhood leukaemia, two of them associated with a poor prognosis and the other ones corresponding to a poor prognosis.

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

Arya, M.; Shergill, I.S.; Williamson, M.; Gommersall, L.; Arya, N.; Patel, H.R.H.. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Review of Molecular Diagnostics 5: 209-219 (2005)

Bar, T.; Stahlberg, A.; Muszta, A.; Kubista, M.. Kinetic Outlier Detection (KOD) in real-time PCR. Nucleic Acids Research 31 (17) e105 (2003)

Bernard, P.S.; Ajioka, R.S.; Kushner, J.P.; Wittwer, C.T.. Homogeneous Multiplex Genotyping of Hemochromatosis Mutations with Fluorescent Hybridization Probes. American Journal of Pathology 153: 1055-1061 (1998)

Biondi, A.; Rambaldi, A.. Molecular diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia. Leukemia Research 20 (10): 801-807 (1996)

Borkhardt, A.; Cazzaniga, G.; Viehmann, S.; Valsecchi, M.G.; Ludwig, W.D.; Burci, L.; Mangioni, S.; Schrappe, M.; Riehm, H.; Lampert, F.; Basso, G.; Masera, G.; Harbott, J.; Biondi, A.. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. Blood 90: 571-577 (1997)

Burgart, L.J.; Robinson, R.A.; Heller, M.J.; Wilke, W.W.; Iakoubova, O.K.; Cheville, J.C.. Multiplex Polymerase Chain Reaction. Modern Pathology 5: 320-323 (1992)

Brownie, J.; Shawcross, S.; Theaker, J.; Whitcombe, D.; Ferrie, R.; Newton, C.; Little, S.. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. Nucleic Acids Research 25: 3235-3241 (1997)

Caplin, B.E.; Rasmussen, R.P.; Bernard, P.S.; Wittwer, C.T.. LightCycler<sup>TM</sup> Hybridization Probes. Biochemica No. 1 (1999)

Casas, I.; Tenorio, A.; de Ory, F.; Lozano, A.; Echevarria, J.M.. Detection of Both Herpes Simplex and Varicella-Zoster Viruses in Cerebrospinal Fluid From Patients With Encephalitis. *Journal of Medical Virology* 50: 82-92 (1996)

Chamberlain, J.S.; Gibbs, R.A.; Ranier, J.E.; Nguyen, P.N.; Caskey, C.T.. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research* 16: 11141-11156 (1988)

Coustan-Smith, E.; Behm, F.G.; Sanchez, J.; Boyett, J.M.; Hancock, M.L.; Raimondi, S.C.; Rubnitz, J.E.; Rivera, G.K.; Sandlund, J.T.; Pui, C.H.; Campana, D.. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* 351: 550-554 (1998)

D'Aquila, R.T. ; Bechtel, L.J. ; Videler ; J.A., Eron, J.J. ; Gorczyca, P. ; Kaplan, J.C.. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. *Nucleic Acids Research* 19: 3749 (1991)

Don, R.H.; Cox, P.T.; Wainwright, B.J.; Baker, K.; Mattick, J.S.. 'Touchdown'-PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19: 4008 (1991)

Van Dongen, J.J.M.; Seriu, T.; Panzer-Grümayer, E.R.; Biondi, A.; Pongers-Willems, M.J.; Corral, L.; Stolz, F.; Schrappe, M.; Masera, G.; Kamps, W.A.; Gadner, H.; van Wering, E.R.; Ludwig, W.D.; Basso, G.; de Bruijn, M.A.C.; Cazzaniga, G.; Hettinger, K.; van der Does-van den Berg, A.; Hop, W.C.J.; Riehm, H.; Bartram, C.R.. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *The Lancet* 352: 1731-1738 (1998)

Evans, P.C. ; Soin, A. ; Wreghitt, T.G. ; Alexander, G.J.. Qualitative and semiquantitative polymerase chain reaction testing for cytomegalovirus DNA in serum allows prediction of CMV related disease in liver transplant recipients. *Journal of Clinical Pathology* 51 : 914-921 (1998)

Ferrari, M. ; Stenirri, S. ; Bonini, P. ; Cremonesi, L.. Molecular Diagnostics by Microelectronic Microchips. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 41 : 462-467 (2003)

Ferrie, R.M.; Schwarz, M.J. ; Robertson, N.H. ; Vaudin, S. ; Super, M. ; Malone, G. ; Little, S.. Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. Am. J. Hum. Genet. 51 : 251-262 (1992)

Gassen, H.G.; Minol, K.. Gentechnik. Gustav Fischer Verlag Stuttgart Jena., 4. Auflage (1996)

Gassen, H.G.; Schrimpf, G.. Gentechnische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin, 2. Auflage (1999)

Gibson, U.E.M.; Heid, C.A.; Williams, P.M.. A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR. Genome Research 6: 995-1001 (1996)

Grace, M.B.; Buzard, G.S.; Hughes, M.R.; Gore-Langton, R.E.. Degradable dUMP Outer Primers in Merged Tandem (M/T)-Nested PCR: Low- and Single-Copy DNA Target Amplification. Analytical Biochemistry 263: 85-92 (1998)

Gutjahr, P.. Krebs bei Kindern und Jugendlichen. Deutscher Ärzte Verlag, 3. Auflage (1993)

Heid, C.A.; Stevens, J.; Livak, K.J.; Williams, P.M.. Real time quantitative PCR. Genome Research 6:986-994 (1996)

Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P.S.; Griffith, R.. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequence. Biotechnology 10: 413-417 (1992)

Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R.. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology 11: 1026-1030 (1993)

Holland, P.M.; Abramson, R.D.; Watson, R.; Gelfand, D.H.. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7276-7280 (1991)

Holzmann, K.. DNA-Chip-Technologie in Ulm – ein integraler Bestandteil moderner, klinischer Grundlagenforschung. BIOSpektrum 2: 200-202 (2006)

Kellogg, D.E.; Sninsky, J.J.; Kwok, S.. Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. Analytical Biochemistry 189: 202-208 (1990)

Kempski, H.; Chalker, J.; Chessells, J.; Sturt, N.; Brickell, P.; Webb, J.; MacDonald Clink, J.; Reeves, B.. An investigation of the t(12;21) rearrangement in children with B-precursor acute lymphoblastic leukaemia using cytogenetic and molecular methods. British Journal of Haematology 105: 684-689 (1999)

Kersey, J.H.. Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. Blood 90 (11): 4243-4251 (1997)

Kreuzer, K.A.; Lass, U.; Bohn, A.; Landt, O.; Schmidt, C.A.. LightCycler Technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts. Cancer Research 59: 3171-3174 (1999)

Kubista, M.; Andrade, J.M.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jonák, J.; Lind, K.; Sindelka, R.; Sjöback, R.; Sjörgreen, B.; Strömbom, L.; Stahlberg, A.; Zoric, N.. The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine 27: 95-125 (2006)

Kurian, K.M.; Watson, C.J.; Wyllie, H.. DNA Chip Technology. Journal of Pathology 187: 267-271 (1999)

Lee, L.G.; Connell, C.R.; Bloch, W.. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research* 21: 3761-3766 (1993)

Longo, M.C.; Berninger, M.S.; Hartley, J.L.. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93: 125-128 (1990)

Moretti, T.; Koons, B.; Budowle, B.. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. *Biotechniques* 25: 716-722 (1998)

Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H.. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51: 263-273 (1986)

Newton, C.R.; Graham, A.. PCR. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford, 2. Auflage (1994)

Nitsche, A.; Steuer, N.; Schmidt, C.A.; Landt, O.; Siegert, W.. Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA. *Clinical Chemistry* 45 (11): 1932-1937 (1999)

PCR: Eine ausgezeichnete Methode. Fa. Roche Publikationen, Techniken für F&E, 68-84; [http://www.roche.com/pages/facetten/pcr\\_d.pdf](http://www.roche.com/pages/facetten/pcr_d.pdf) (2003)

Rabbitts, T.H.. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372:143-149 (1994)

Radström, P.; Bäckman, A.; Quian, N.; Kraghsbjerg, P.; Pahlson, C.; Olcen, P.. Detection of Bacterial DNA in Cerebrospinal Fluid by an Assay for Simultaneous Detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococci* Using a Seminested PCR Strategy. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (11): 2738-2744 (1994)

Rebollo, M. J.; San Juan Garrido, R.; Folgueira, D.; Palenque E.; Diaz-Pedroche, C.; Lumbreras, C.; Aguado, J.M.. Blood and urine samples as useful sources for the detection of tuberculosis by polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 56: 141-146 (2006)

Repp, R.; Borkhardt, A.; Haupt, E.; Kreuder, J.; Brettreich, S.; Hammermann, J.; Nishida, K.; Harbott, J.; Lampert, F. Detection of four different 11q23 chromosomal abnormalities by multiplex-PCR and fluorescence-based automatic DNA-fragment analysis. *Leukemia* 9: 210-215 (1995)

Repp, R.; Rascher, W.. Verfahren zur Detektion von Nukleinsäureamplifikationsprodukten unter Verwendung von Primern mit "Primer-integrierten Reporter-sequenzen" (PIRS). Patentschrift WO 00/75369 A1 (2000)

Rychlik, W.; Spencer, W.J.; Rhoads, R.E.. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research* 18 (21): 6409-6412 (1990)

Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A.. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491 (1988)

Sarkar, G.; Sommer, S.S.. Parameters affecting susceptibility of PCR contamination to UV inactivation. *Biotechniques* 10: 590-594 (1991)

Schild, T.A.. Einführung in die Real-Time TaqMan<sup>TM</sup> PCR-Technologie. Version 2.1 (1996)

Steffen, C.; Ankenbauer, W.; Bauer-Hofmann, R.; Bye, S.; Eisel, D.; Frey, B.; Keesey, J.; Rosenstraus, M.; Schäferkordt, S.; Schlicht, H.J.. Roche Molecular Biochemicals: PCR Application Manual, 2. Auflage, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (1999)

Stryer, L.; Haugland, P.. Energy Transfer: A Spectroscopic Ruler. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 58: 719-726 (1967)

Tobler, N.E.; Pfunder, M.; Herzog, K.; Frey, J.E.; Altwegg, M.. Rapid detection and species identification of Mycobacterium spp. using real-time PCR and DNA-Microarray. Journal of Microbiological Methods 66: 116-124 (2006)

Viehmann, S.; Borkhardt, A.; Lampert, F.; Harbott, J.. Multiplex PCR – a rapid screening method for detection of gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia. Annals of Hematology 78: 157-162 (1999)

Watson, J.D.; Crick, F.H.. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171: 737–738 (1953)

Wilfingseder, D.; Stoiber, H.. Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch real-time PCR-Verfahren. Antibiotika Monitor 18. Jahrgang, Heft1/2 (2002)

Wong et al.. bcr/abl translocation in adult ALL: a comparison of conventional and interphase cytogenetic studies. Cancer Genet. Cytogenet 110: 19-22 (1999)

Zambrano, Y.; Chiarello, A.; Soca, A.; Villalobos, I.; Marrero, M.; Soler, M.; Laferte y Maritza Alvarez, J.. Use of Polymerase Chain Reaction for the diagnosis of Central Nervous System infections. Investigación Clínica 47: 337-347 (2006)



## 10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Abb.	Abbildung
a.dest.	aqua destillatum
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGH	Comparative Genom Hybridisierung
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalie Virus
C <sub>T</sub>	threshold cycle
DABCYL	4-(Dimethylaminoazo)benzene-4-Carboxylsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtrisphosphat
dUTP	Desoxyribouraciltrisphosphat
dsDNA	doppelstrang Desoxyribonucleinsäure
dTTP	Desoxyribothymintrisphosphat
E. coli	Escherichia coli
FAM	6-Carboxyfluorescein
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
G	Guanin
HANDS	Homo Tail Assisted Non Dimer System
HEX	Hexachloro-6-carboxyfluorescein
HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
JOE	2,7-Dimethoxy-4.5-dichloro-6-carboxyfluorescein
kb	kilobasen
LED	lichtemittierende Diode

---

M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
nRNA	nucleare Ribonukleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Primer Dimer
PIRS	Primerintegrierte Reportersequenzen
RACE-PCR	rapid amplifikation of cDNA ends-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
R <sub>n+</sub>	Reborterfarbstoffintensität
R <sub>n-</sub>	Quenscherfarbstoffintensität
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
T	Thymin
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
Taq	Thermus aquaticus
TET	Tetrachloro-6-carboxyfluorescein
T <sub>m</sub>	Annealing Temperature
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Uracil
UNG	Uracil-N-Glykosylase
UV	Ultraviolett

## 11. DANKSAGUNG

Für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Begleitung und die konstruktive Kritik bei der Erstellung der Arbeit möchte ich Professor Dr. Reinald Repp danken.

Herrn Professor Dr. Arndt Borkhardt danke ich für die Bereitstellung der in der Arbeit verwendeten Zelllinien. Frau Ulla Jacobs, Frau PD Dr. Ina Kerr und Frau Dr. Birgit Weber danke ich für die Einarbeitung in die Labormethoden und die Unterstützung bei der Lösung vieler Probleme.

Herr Professor Dr. Gortner ermöglichtes es mir, auch nach dem Wechsel von Herrn Professor Dr. Repp nach Erlangen, meine Versuche in Giessen weiter durchzuführen. Hierfür nochmals vielen Dank.

Die Zusammenarbeit mit Dr. vet. med. Martin Schmitt und Dr. vet. med. Peter Kopp ermutigte mich, nach meiner Ausbildung als MTA nochmals ein Studium zu beginnen. Ohne ihre Unterstützung wäre ich diesen Weg nicht gegangen.

Danken möchte ich meiner Cousine Anja Schön und meiner Schwägerin Bärbel Weigand, die es in Rekordzeit geschafft haben, meine Arbeit Korrektur zu lesen.

Auch möchte ich die Gelegenheit nutzen, meinen Eltern zu danken. Sie haben mich auf meinem Weg bis hin zur Fertigstellung dieser Arbeit immer unterstützt und meine Wünsche und Ziele immer respektiert.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Thomas Burgard für seine Geduld beim ertragen meiner Launen und für seine uneingeschränkte Unterstützung auf meinem Weg bis hin zur Fertigstellung dieser Arbeit.